

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

Gezielte molekulare Therapie des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms

***In vitro* Wirksamkeit der monoklonalen
Anti-CD20-Antikörper Rituximab und
Obinutuzumab sowie der PI3K-Inhibitoren
LY294002 und Idelalisib in Mono- und
Kombinationstherapie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Nico Joachim Peter
aus Nürnberg
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München.

Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin Dreyling
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Christoph Nerl Prof. Dr. Ralf Schmidmaier Prof. Dr. Tobias Feuchtinger
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Anna Zöllner
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	11.04.2019

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Martin Dreyling für seine uneingeschränkte Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung dieser Arbeit. Es war mir eine große Ehre und Freude Teil der AG Dreyling gewesen zu sein.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. med. Anna Zöllner für ihre intensive Betreuung, Geduld, Engagement und Vertrauen.

Mein Dank gilt auch den herausragenden Mitarbeitern der AG Dreyling. Ich bedanke mich bei Dr. Grit Hutter und Yvonne Zimmermann für ihre geduldigen Einweisungen, Beratung und herzliche Zusammenarbeit, ohne die diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.

Darüberhinaus gilt mein Dank den vielen anderen Mitarbeitern, Mitdoktoranden und Vorgängern.

Ich widme diese Arbeit den Menschen die mich immer unterstützt und geliebt haben, meinem Vater Dr. med. Joachim Peter, meiner Mutter Ramona und meiner Schwester Nadine.

Veröffentlichte Ergebnisse aus dieser Arbeit

Teile dieser Arbeit wurden in folgender
Publikation veröffentlicht:

Zoellner AK, Peter N, Zimmermann Y, Hutter G, Hiddemann W, Dreyling M; Transient Antagonism of anti-CD20 monoclonal Antibodies and PI3K Inhibitor Idelalisib in DLBCL cell lines. Eur J Haematol. 2018 Apr 4. doi: 10.1111/ejh.13075.

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
1.1 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	2
1.1.3 Klinische Manifestation	2
1.1.4 Morphologie	3
1.1.5 Immunphänotypische Kennzeichen	3
1.1.6 Genetische Alterationen und Aberrationen im DLBCL	4
1.1.7 Genexpressionsanalyse	5
1.1.8 Prognose und prädiktive Faktoren	6
1.1.9 Therapie	7
1.2 Anti-CD20 monoklonale Antikörper	9
1.2.1 Das CD20-Molekül	9
1.2.2 Wirkmechanismen	9
1.2.3 Rituximab	12
1.2.4 Obinutuzumab	13
1.3 Gezielte molekulare Therapie des PI3K-Signalweges	14
1.3.1 Pan-PI3K-Inhibitor LY294002	18
1.3.2 Selektiver PI3K δ -Inhibitor Idelalisib	18
2. Ziel dieser Arbeit	20
3. Materialien	21
3.1 Zelllinien	21
3.2 Inhibitoren	21
3.3 Lösungen, Puffer und Antikörper	22
3.3.1 Allgemeines	22
3.3.2 Anti-CD20-Antikörper	22
3.3.3 Antikörper für Western Blot	22
3.3.4 Fertigreagensysteme	23
3.3.5 Lysepuffer	23
3.3.6 Pufferlösungen	23
3.3.7 Reagenzien	24
3.3.8 Verbrauchsmaterialien	25
3.3.9 Western Blot-Gele	25
3.3.10 Zellkulturmedien	25
3.4 Hilfsmittel und Geräte	26
3.5 Software und EDV	26
4. Methoden	27
4.1 Zellkultur	27
4.1.1 Zellkulturbedingungen	27
4.1.2 Behandlung von Zellen	28
4.2 Trypanblau-Ausschlusstest	28
4.2.1 Vi-CELL™ Zellquantifizierung	29
4.2.2 Extraktion mittels Dichtegradientenzentrifugation	29
4.3 WST-1-Proliferationsassay	30
4.4 Durchflusszytometrie	31
4.4.1 Funktionsweise	31
4.4.2 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid	31
4.4.3 Analyse der Apoptose mit Annexin V-PE/7-AAD-Färbung	33
4.5 Proteinanalyse mittels Western Blot	35
4.6 Das „fraction of product“-Konzept	39

4.7 Statistische Auswertung	39
5. Ergebnisse	40
5.1 Wirkung der Anti-CD20-Antikörper.....	40
5.1.1 Obinutuzumab induziert homotypische Adhäsion	40
5.1.2 Anti-CD20-Antikörper hemmen die Proliferation	40
5.1.3 Anti-CD20-Antikörper verursachen G1-Arrest.....	44
5.1.4 Anti-CD20-Antikörper induzieren Zelltod	46
5.1.5 Anti-CD20-Antikörper beeinflussen den PI3K-, ERK- und p38 MAPK-Signalweg	49
5.2 Wirkung von Inhibitoren des BCR-Signalwegs	52
5.2.1 PI3K-Inhibitoren induzieren Proliferationshemmung	52
5.2.2 PI3K-Inhibitoren induzieren G1-Arrest des Zellzyklus	55
5.2.3 PI3K-Inhibitoren induzieren Apoptose	56
5.2.4 PI3K-Inhibitoren führen zur Inhibition der PI3K- und ERK1/2-Signalwege...	59
5.3 Kombination von Anti-CD20-Antikörpern mit Inhibitoren des PI3K-Signalweges.....	61
5.3.1 Proliferationshemmung	61
5.3.2 Alterationen im Zellzyklus.....	64
5.3.3 Induktion zytotoxischer Effekte.....	66
5.3.4 Alteration der PI3K- und ERK1/2-Signalwege	69
5.4 Einfluss der Kombinationstherapie auf gesunde Lymphozyten	71
6. Diskussion	72
6.1 Einleitung	72
6.2 In vitro Wirksamkeit der Anti-CD20-Antikörper	73
6.3 In vitro Wirksamkeit von Inhibitoren der PI3-Kinase	80
6.4 Kombination von Anti-CD20-Antikörpern und PI3K- Inhibitoren.....	82
6.5 Limitationen dieser Arbeit	87
7. Zusammenfassung.....	89
8. Abkürzungsverzeichnis	91
9. Anhang	93
10. Literaturverzeichnis	99

1. Einführung

1.1 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) ist mit 25-30% das häufigste Non-Hodgkin-Lymphom des Erwachsenen. Die Inzidenz in Europa und den USA beträgt derzeit ca. 7-10 Fälle pro 100.000 Einwohner/Jahr (1). Das mediane Erkrankungsalter liegt im 7. Lebensjahrzent und damit später als bei anderen aggressiven Lymphomen (1). Allerdings können DLBCLs auch bei Kindern und jungen Erwachsenen auftreten. Das Lymphom betrifft etwas häufiger Männer als Frauen (1-3). Die Bezeichnung „diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom“ (DLBCL) umfasst eine heterogene Gruppe von Neoplasien.

Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, nicht-anders spezifiziert (NOS)	
Häufige morphologische Varianten <ul style="list-style-type: none"> - Zentroblastisch - Immunoblastisch - Anaplastisch 	Seltene morphologische Varianten z.B: Siegelringkonformation
Molekulare Untergruppen <ul style="list-style-type: none"> - Germinal centre B-cell-like (GCB) - Activated B-cell-like (ABC) 	Immunhistochemische Untergruppen <ul style="list-style-type: none"> - CD5-positive DLBCL - Germinal centre B-cell-like (GCB) - Non-germinal centre B-cell-like (non-GCB)
Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom Untergruppen	
<ul style="list-style-type: none"> - T-Zell, histiozytenreiches großes B-Zell-Lymphom - Primäres DLBCL des ZNS - Primäres kutanes DLBCL, Bein-Typ - EBV-positives DLBCL des Älteren 	
Andere großzellige B-Zell-Lymphome	
<ul style="list-style-type: none"> - Primäres mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom - Intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom - DLBCL assoziiert mit chronischer Entzündung - Lymphomatoide Granulomatose - ALK-positives LBCL - Plasmablastisches Lymphom - Großzelliges B-Zell-Lymphom in HHV-8-assoziiert multizentrischer Castleman Erkrankung - „Primary effusion“-Lymphom 	
Borderline-Lymphome	
<ul style="list-style-type: none"> - B-Zell-Lymphom, nicht-klassifizierbar, mit Eigenschaften zwischen DLBCL und Burkitt Lymphom - B-Zell-Lymphom, nicht-klassifizierbar, mit Eigenschaften zwischen DLBCL und klassischem Hodgkin Lymphom 	

Abb. 1: Klassifizierung des DLBCL. Modifiziert nach WHO (1).

Sie sind morphologisch definiert durch die Zellkerngröße, diese muss gleich oder größer sein als Makrophagen-Zellkerne oder mehr als die doppelte Größe

eines normalen Lymphozyten-Zellkerns aufweisen. Darüberhinaus sind sie durch ein diffuses Wachstumsmuster charakterisiert. Eine Reihe von Studien haben DLBCLs in morphologische, immunphänotypische und genetische Gruppen unterteilt (Abb. 1). Dennoch kann die Mehrzahl der Fälle keiner dieser Untergruppen zugeordnet werden. Diese DLBCL werden als NOS (not other specified / nicht anders spezifiziert) zusammengefasst. Die weiteren Ausführungen beziehen sich auf DLBCL, NOS (1).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die genaue Ätiologie der DLBCL ist unbekannt. Die Mehrzahl der Fälle entstehen *de novo* und werden als primäre DLBCL bezeichnet. Seltener entstehen sie sekundär, durch Transformation oder Progression niedrig maligner Lymphome, wie der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) und des kleinzelligen lymphatischen Lymphoms (SLL) (1, 4).

Immunsuppression ist ein signifikanter Risikofaktor für die Lymphomentstehung. Erkrankungen, die mit Immunsuppression einhergehen, wie Erkrankungen die durch den HI-Virus oder Hepatitis C-Virus verursacht werden, sowie iatrogen induzierte Immunsuppression nach Organtransplantation, weisen eine erhöhte Lymphominzidenz auf. Interessanterweise sind diese Lymphome öfter Epstein-Barr-Virus positiv als sporadische Lymphome (5, 6). Als weitere Risikofaktoren konnten die Exposition gegenüber alkylierenden Chemotherapeutika, insbesondere in Kombination mit Bestrahlung (4) sowie die Exposition gegenüber Pestiziden, Fungiziden und Schmiermittel identifiziert werden (7, 8).

1.1.3 Klinische Manifestation

Die Patienten präsentieren sich mit nodaler oder in bis zu 40% initial extranodaler Manifestation der Neoplasie (9). Der häufigste Ort der extranodalen Manifestationen ist der Gastrointestinaltrakt, vor allem im Bereich des Magens und der Iliozökalregion. Weitere häufige Manifestationsorte umfassen den Knochen, Hoden, Milz, Waldeyerscher Rachenring, Speicheldrüsen, Schilddrüse, Leber, Niere, Nebenniere und Haut. Allerdings können sich DLBCL in jeder Körperregion manifestieren. Eine

Knochenmarksbeteiligung findet sich in 11-27% der Fälle. Hierbei kann zwischen konkordantem Befall mit DLBCL Zellen und diskordantem Befall mit anderen, niedrig malignen Lymphomzellen unterschieden werden (10, 11). Die Mehrzahl der Patienten ist asymptomatisch und präsentiert sich mit schnell wachsenden Tumormassen an einem oder mehreren Manifestationsorten. Dies entspricht in mehr als der Hälfte der Fälle einem Stadium I und II. Die klinischen Symptome der Patienten hängen stark vom Manifestationsort des Lymphoms ab (1-3). Die klinische Präsentation, der Verlauf und die Prognose werden maßgeblich vom Befall extranodaler Gewebe beeinflusst. Ein lokalisiertes Auftreten zeigt sich bei etwa 20% der Patienten. Ein disseminierter extranodaler Befall ist seltener. Etwa ein Drittel der Patienten zeigt systemische Symptome (4).

1.1.4 Morphologie

Die befallenen Lymphknoten zeigen eine diffuse Proliferation lymphoider Zellen, die zur partiellen oder kompletten Zerstörung der Lymphknotenarchitektur führt. Ein partieller Lymphknotenbefall zeigt sich interfollikulär und/oder sinusoidal. Das umgebende Lymphknotengewebe ist häufig befallen. In einigen Fällen findet sich Sklerose. Das DLBCL zeigt verschiedene mehr oder weniger häufige zytomorphologische Ausprägungen. Zu den häufigen Ausprägungen zählen die zentroblastische, die immunoblastische sowie die anaplastische Zellmorphologie. Am häufigsten zeigt sich ein gemischtes Bild aus Immunoblasten und Zentroblasten (1).

In 10-15% der Fälle dominiert einer der Zelltypen und macht 90% der Population aus. Diese Fälle werden als zentroblastär oder immunoblastär bezeichnet. Weitere morphologische Ausprägungen umfassen multilobuläre Zellen, DLBCL mit myxoiden oder fibrillären Eigenschaften, spindelförmige und Siegelringkonformationen (4).

1.1.5 Immunphänotypische Kennzeichen

Die neoplastischen Zellen exprimieren B-Zell-Marker wie CD19, CD20, CD22 und CD79a. Allerdings können auch einer oder mehrere dieser Marker fehlen

(1). Der Nachweis von Immunglobulinen auf der Zelloberfläche oder im Plasma zeigt sich in 50-75% der Fälle (IgM>IgG>IgA) (12). Die zytoplasmatischen Immunglobuline korrelieren dabei nicht mit der Expression von Plasmazellmarkern wie CD38 und CD138. Beide Marker sind nur selten koexprimiert in CD20-positiven Zellen. CD30 wird insbesondere in der anaplastischen Variante exprimiert (13). In 10% der Fälle exprimieren die Zellen CD5 (14). Diese CD5-positiven Varianten repräsentieren in der Regel primäre Lymphome und entwickeln sich nur selten aus CLL/SLL. Sie können vom Mantelzelllymphom durch die Abwesenheit von Cyclin D1 abgegrenzt werden (15, 16). Die Inzidenz von CD10, BCL-6 und IRF4/MUM-1-Expression variiert in verschiedenen Studien (1). Das Oberflächenmolekül CD10 kann in 30-60%, BCL-6 in 60-90% und IRF4/MUM1 in 35-65% der Fälle gefunden werden (17-22). Die Proliferationsfraktion, gemessen durch Ki67-Färbung, ist hoch und beträgt zwischen 40 und 90% (1, 23). Die prognostische Relevanz einiger dieser Marker wurde gezeigt und führte zu immunphänotypischen Unterteilungen der DLBCL in die GCB- (germinal center-like) und Non-GCB Untergruppe (non-germinal center-like) (19, 24). GCB-DLBCL sind klassifiziert durch eine CD10 Expression >10%, sind CD10-/BCL6+ oder IRF4/MUM1-negativ. Alle anderen Fälle werden als Non-GCB klassifiziert (1). Es konnte jedoch keine exakte Übereinstimmung dieser immunphänotypischen Klassifizierung mit der Unterteilung die auf Genexpressionsanalysen basiert gezeigt werden. Eine bessere Einteilung durch immunphänotypische Marker könnte durch die Erweiterung um BCL-2 und Cyclin D2 erreicht werden. Bisher hat diese Art der Unterteilung jedoch keinen therapeutischen Nutzen (1).

1.1.6 Genetische Alterationen und Aberrationen im DLBCL

DLBCL weisen verschiedenste genetische Veränderungen auf. Diese Veränderungen umfassen somatische Hypermutationen der variablen Regionen von Immunglobulinen, aberrante somatische Hypermutationen von multiplen Genen (wie PIMI, MYC, RHOH/TTF /ARHH und PAX5) in mehr als 50% der Fälle sowie chromosomale Translokationen. In bis zu 30% der Fälle zeigen sich Veränderungen der 3q27 Region und betreffen das BCL-6 Gen. Dies ist die häufigste Translokation im DLBCL. Translokationen die das BCL-2-Gen

betreffen, wie die Translokation t(14;18), zeigen sich in 20-30% der Fälle. Aberrationen des MYC-Gens finden sich in bis zu 10% der Fälle und sind häufig mit komplexen genetischen Veränderungen assoziiert. Etwa 20% dieser Fälle zeigen zudem eine IGH-BCL2-Fusion und/oder Veränderungen von BCL-6 und zeichnen sich durch eine besonders hohe Proliferationsrate aus (1).

Charakteristikum	ABC	GCB
t(14;18)	-	35%
3q gain/amplification	26%	-
3p gain/amplification	6%	-
12q12	5%	20%
Ongoing IG mutations	-	+
BCL-2 rearrangement	-	20-25%
REL amplification	-	15%
NFkB activation	+	-
5 Jahres-Überlebensrate	15-30%	50-60%

Abb. 2: Typische genetische Aberrationen des ABC- und GCB-Subtyps und Prognose. Modifiziert nach (1).

1.1.7 Genexpressionsanalyse

Alizadeh et al. (25) gelang mittels Genexpressionsanalyse die Unterteilung der DLBCL in zwei Untergruppen. Die GCB-DLBCL zeigen das Expressionsprofil von Keimzentrum-B-Zellen (*germinal-centre B-cell-like*) und machen 45-50% der Fälle aus. Die zweite Gruppe, genannt ABC-DLBCL (*activated B-cell-like*) weist das Expressionsprofil von aktivierten B-Zellen des peripheren Blutes auf (1, 25). Initial wurde eine dritte Gruppe klassifiziert, die weder ABC noch GCB zuzuordnen war. Dieser Typ 3 stellt allerdings keine eigene Untergruppe dar (1). Die ABC- und GCB-Untergruppe sind mit verschiedenen chromosomalen Veränderungen assoziiert (Abb. 4). Eine Reihe von Studien haben gezeigt, dass weder durch die Morphologie noch durch Immunphänotypisierung sicher auf den molekularen Subtyp geschlossen werden kann (1). Der genetische Subtyp hat einen starken Einfluss auf die Prognose. Der ABC-Subtyp ist dabei mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert als GCB-DLBCL (26).

1.1.8 Prognose und prädiktive Faktoren

In der Prä-Rituximab-Ära betrugen die Langzeit-Remissionsraten zwischen 50-60% (1). Die individuelle Prognose variierte sehr stark. Dennoch hat sich der Internationale Prognostische Index (IPI), basierend auf fünf klinischen Parametern, als sehr wertvoll erwiesen (3). In der Rituximab-Ära wurde ein revidierter IPI vorgestellt. Dabei sind IPI und rIPI gleichwertig in der Evaluation der Prognose von DLBCL-Patienten (27). Während ein konkordanter Knochenmarksbefall unabhängig vom IPI mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, zeigt ein diskordanter Befall keinen Einfluss auf die Prognose (11). Der prognostische Wert der Zellmorphologie bleibt umstritten. Einige Studien assoziierten die immunoblastische Variante mit einer schlechten Prognose, dies konnte in anderen Studien nicht bestätigt werden (1). Das Verständnis pathogenetischer Faktoren und deren Einfluss auf die Prognose sowie die Entwicklung zielgerichteter therapeutische Strategien ist Gegenstand der Forschung (4). Einige immunhistochemische Marker sind mit einer schlechten Prognose assoziiert. Hierzu gehört die Expression von BCL-2, XIAP, IRF4/MUM1, Cyclin D2, Cyclin D3, p53, CD5, FOXP1, PKC-beta, ICAM1, HLA-DR und c-Flip. Die Marker BCL-6, CD10 und LMO2 konnten mit einer besseren Prognose assoziiert werden. Auf Basis dieser Studien entwickelte Hans et al. (24) die sogenannten „Hans classifler“, die DLBCL Patienten in Gruppen mit guter und schlechter Prognose unterteilt. Allerdings zeigten sich große Probleme in der Reproduzierbarkeit dieser Einteilung (1). Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Rituximab den prognostischen Wert von BCL-2 und BCL-6 verringert (1). Darüberhinaus sind EBV-positive DLBCL mit einer schlechteren Prognose assoziiert als EBV-negative DLBCL (6). Eine hohe Proliferationsfraktion basierend auf dem Ki67-Index konnte in einigen Studien als negativer Prädiktor gezeigt werden. Andere Studien konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen (1). Während Studien in Bezug auf BCL6 und TP53 Mutationen keinen eindeutigen prognostischen Wert zeigen konnten, wiesen Patienten mit MYC-Mutationen eine besonders schlechte Prognose auf (1). Die Unterteilung in den molekularen GCB- und ABC-Subtyp konnte ihren prognostischen Wert beweisen. Patienten mit GCB-Subtyp haben eine signifikant bessere Prognose als ABC-DLBCL (26). Darüberhinaus spielt das Zellmilieu eine Rolle in der Prognose. Der Verlust von MHC-Klasse-II-Genen

und Proteinen korreliert mit einer deutlich schlechteren Prognose als Patienten mit intaktem MHC-II-Komplex (1).

1.1.9 Therapie

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom ist ein aggressives, aber bei einem Teil der Patienten heilbares Lymphom. Die Heilungsrate ist insbesondere bei Patienten mit lokalisiertem Befall sehr hoch und das progressionsfreie 5-Jahresüberleben beträgt in diesen Fällen bis zu 80%. Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung erreichen eine progressionsfreie 5-Jahresüberlebensrate von bis zu 50% (4). Die Entwicklung von Rituximab revolutionierte die Lymphomtherapie. Die Kombination von Rituximab mit Chemotherapeutika im Rahmen des R-CHOP Regime stellt einen wichtigen Pfeiler in der Behandlung einer Vielzahl hämatologischer Malignitäten dar (4, 28). Das R-CHOP Regime ist die Standardtherapie des DLBCL. Die Intensität der Erstlinientherapie hängt von zwei Faktoren ab, dem altersadaptierten IPI und dem Alter des Patienten (4). Abbildung 3 (Seite 8) gibt einen Überblick über den Entscheidungspfad zur Auswahl einer Erstlinientherapie.

Internationaler Prognostischer Index (IPI) und Erstlinientherapie

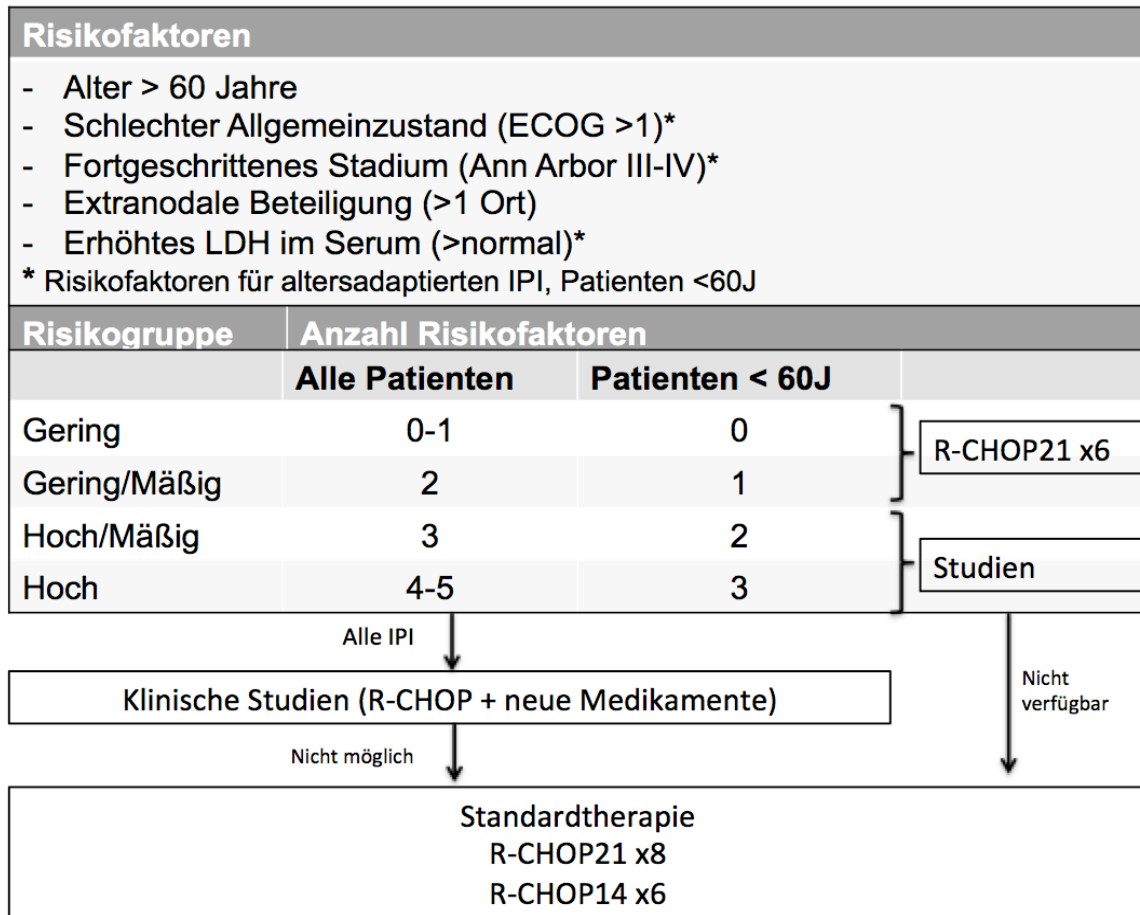


Abb. 3: Auswahl der Erstlinientherapie nach altersadaptierten Internationalen Prognostischem Index. Modifiziert nach (4).

Das R-CHOP Regime alle 14 oder 21 Tage ist die Standardtherapie des älteren Patienten aller IPI-Gruppen. Ob 14 Tage Intervalle oder 21 Tage Intervalle von Vorteil sind, ist Gegenstand derzeitiger Studien (4). Beim jungen Patienten wird eine Niedrigrisikogruppe (<60J, aalPI = 0-1) von einer Hochrisikogruppe (< 60J, aalPI = 2-3) abgegrenzt. Aktuelle Studien legen nahe, dass junge Hochrisikopatienten mit der Kombination aus Hochdosismchemotherapie und anschließender autologer Stammzelltransplantation, ausschließlich im Rahmen von Studien behandelt werden sollten. Die Stammzelltransplantation wird für Patienten empfohlen, die keine komplette Remission nach der Erstlinientherapie erreichen. Radiotherapie wird nur für Patienten mit „bulky disease“, die keine Komplettremission nach Immunochemotherapie erreichen, empfohlen. Ältere Patienten mit hohem IPI-Score, erhöhtem LDH Serumlevel oder extranodalem Befall, sollten eine ZNS-Prophylaxe im Rahmen der

Erstlinientherapie erhalten. Patienten mit chemosensiblen Rezidiven sollten eine Stammzelltransplantation erhalten. Die Prognose von Patienten, die aufgrund ihres Alters oder Komorbiditäten nicht mit einer Stammzelltransplantation behandelt werden können, ist sehr schlecht. Besonders für diese Gruppe von Patienten stellen neue, weniger toxische Medikamente und biologisch gezielte Therapien eine große Hoffnung dar (4).

1.2 Anti-CD20 monoklonale Antikörper

1.2.1 Das CD20-Molekül

Das Oberflächenprotein CD20-Molekül wird ausschließlich von B-Lymphozyten exprimiert (29). Die erstmalige Isolation und Klonierung von CD20, als Ziel des Antikörpers B1, gelang 1988 zwei Gruppen parallel (30, 31). CD20 ist ein spezifischer Marker für B-Lymphozyten und wird während fast aller Differenzierungsstufen exprimiert. Erstmals taucht es während der Stufe des Prä-B-Lymphozyten auf und bleibt erhalten bis zu seiner Degradierung beim Ausreifen zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle (29, 32). Der Genlocus für CD20 befindet sich auf Chromosom 11q12 (29). Das 33-37 kDa große Protein wird auf der Oberfläche von normalen und malignen Zellen exprimiert und stellt daher einen geeigneten Angriffspunkt für die Therapie von B-Zell-Malignitäten dar (29). Arbeiten zur Biologie des CD20-Moleküls legen eine Funktion als Calciumkanal nahe der durch Bindung eines B-Zell-Rezeptor Antigens aktiviert wird (33). Die physiologische Funktion von CD20 ist nicht komplett verstanden. Allerdings ist das CD20-Molekül in eine Reihe zellulärer Signalmechanismen eingebunden, die wichtig für Proliferation, Aktivierung, Differenzierung und Apoptose der Zellen sind (29).

1.2.2 Wirkmechanismen

Der wissenschaftliche Beitrag von Köhler und Milstein und die Anwendung der monoklonalen Antikörper Technologie stellte einen wichtigen Schritt in Richtung einer gezielten Tumorthherapie dar (34). 1997 wurde mit Rituximab der erste monoklonale Antikörper von der FDA zum klinischen Einsatz zugelassen (34).

Eine Reihe von Studien über die Biologie und den Wirkmechanismus von Antikörpern gegen CD20 wurden durchgeführt (36-50).

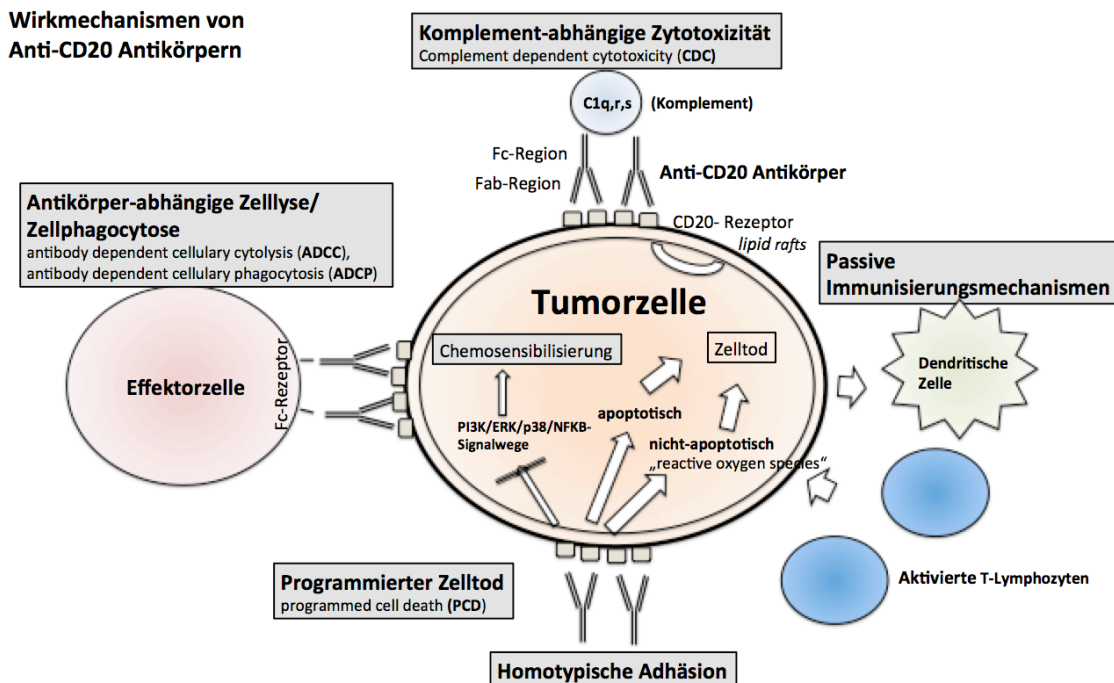


Abb. 4: Wirkmechanismen von Anti-CD20-Antikörpern. Modifiziert nach (35).

Der Wirkmechanismus von Anti-CD20-Antikörpern war in den letzten Jahren Gegenstand umfangreicher Untersuchungen. *In vivo* entfalten Anti-CD20-Antikörper ihre Wirkung über vier verschiedene Mechanismen. Zum einen verursachen sie Fc-Fc-γ-Rezeptor vermittelte Wirkmechanismen (ADCC) und antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (ADCP) (36-38). Zudem vermitteln Anti-CD20-Antikörper komplementabhängige Wirkmechanismen (37), direkte Induktion von Zelltod (PCD) (33, 39) sowie passive Immunisierungsmechanismen (vgl. Abb. 4, Seite 10) (40).

Der Einfluss der unterschiedlichen Mechanismen ist abhängig vom benutzten Mausmodell und der Art des Antikörpers (34). Cragg et al. (33) charakterisierten ursprünglich zwei Subtypen von Anti-CD20-Antikörpern. Typ-I Rituximab-like monoklonale Antikörper relokalisieren den CD20-Rezeptor in cholesterinreiche Domänen der Membran und führen zu komplementabhängiger Zytotoxizität. Typ-II-Antikörper induzieren stärker ausgeprägten direkten Zelltod, besitzen aber nicht die Fähigkeit zur Relokalisierung von CD20. Die beiden Subtypen unterschieden sich nicht hinsichtlich Fc-Rezeptor-vermittelter

Wirkmechanismen (34). Das Ausmaß des induzierten Zelltods ist vom Typ des Antikörpers abhängig. Der Antikörper „B1“ stellt den potentesten Anti-CD20-Antikörper dar. Das Ausmaß der direkt zytotoxischen Mechanismen korreliert mit der Induktion von homotypischer Adhäsion (41). In einigen Zelllinien beeinflussen Anti-CD20-Antikörper neben diesen vier Effektormechanismen auch intrazelluläre Signalkaskaden die zu Zellzyklusarrest und Apoptose führen (42, 43). Bonavida et al. (44) zeigten inhibitorische Effekte auf die konstitutiv aktivierten intrazellulären Signalwege Raf-1-MEK1/2-ERK1/2, den p38 MAPK-Signalweg, NF-κB und den PI3K-AKT-mTor-Signalweg. Dies führt zu einer Inhibition des Zellwachstums und Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber Chemotherapie (44). *In vitro* inhibierte Rituximab den p38MAPK-Signalweg, die IL-10/IL-10-Rezeptor Signalkaskade, konstitutives STAT3-Signaling und führte über Inhibition der BCL-2-Expression zu Chemosensibilisierung (29). Es sind auch Mechanismen über die p38 MAPK beschrieben, die direkt Apoptose verursachen (45). Desweiteren führte Rituximab zu Hochregulierung von RKIP (Raf-1 kinase inhibitor protein). RKIP reguliert zwei Überlebenssignalwege negativ: ERK1/2- (extracellular signal-regulated kinase 1/2) und den NF-κB-Signalweg (29). Herunterregulierung dieser zwei Signalkaskaden führt zur Inhibition der BCL-XL Expression und dadurch zur Chemosensibilisierung (29). Rituximab verursachte moderate Apoptose in bestimmten NHL-Zelllinien (46). Heinrich et al. (47) untersuchten die Genexpression von MCL-Zelllinien nach Behandlung mit Rituximab oder Obinutuzumab. Es zeigten sich sowohl gemeinsam deregulierte Gene als auch Gene die nur durch Rituximab oder nur durch Obinutuzumab dereguliert wurden. Dies weist auf Unterschiede zwischen Typ-I und Typ-II-Antikörper auf Ebene der Genexpression hin (47). Erwähnenswert ist die Hochregulierung von EGR1 als Komponente des BCR-Signalweges, DUSP2 als Komponente des ERK1/2-Signalweges sowie NFKBIE und NFATC1 als Komponenten des NF-κB- und PI3K-Signalweges. Zudem deregulierte Rituximab den Zelltodregulator BCL-2A1. Es wird deutlich, dass Anti-CD20-Antikörper zu einem breiten Spektrum von Veränderungen in verschiedenen intrazellulären Signalwegen führen (47).

Die Antitumoraktivität von Rituximab konnte gesteigert werden, wenn ein zweiter Antikörper zur Bildung von IgG-IgG Homodimere zugesetzt wurde. Dies wird als „crosslinking“ bezeichnet. Diese Homodimere verursachen abhängig

vom gebundenen Oberflächenmolekül Zellzyklusarrest oder induzieren Apoptose (48). Byrd et al. (49) zeigten *in vivo* eine Korrelation der Prognose von B-CLL Patienten mit dem Ausmaß an Apoptose, charakterisiert durch Spaltung der Caspase-3 und 9, unter Rituximab Therapie (49). Andere *in vitro* Arbeiten konnten keinen Zusammenhang zwischen Caspaseaktivität und Ausmaß der induzierten Apoptose feststellen (41). Gemeinsamkeiten zwischen B-Zellrezeptor-vermitteltem Zelltod und Apoptose nach Anti-CD20-Behandlung sind erwähnenswert (50). Chan et al. (41) zeigten in ihrer Arbeit jedoch keinen Zusammenhang zwischen B-Zell-Rezeptor-induzierter Apoptose und dem Wirkmechanismus der durch den Anti-CD20-Rezeptor vermittelt wird. Diese Erkenntnisse über die Wirkmechanismen der Anti-CD20-Antikörper haben zu einer intensiven Suche nach neueren, effektiveren Anti-CD20-Antikörpern geführt (34).

1.2.3 Rituximab

In den 1990er Jahren begann mit der Zulassung des chimären Anti-CD20-Antikörpers Rituximab zur Therapie von B-Zell-Lymphomen eine neue Ära der Lymphomtherapie. Rituximab besitzt zwei bedeutende Eigenschaften, die es als Antitumormedikament bedeutsam machen. Zum einen wirkt Rituximab gezielt auf den CD20-Rezeptor, der von den meisten B-Zell-Lymphomen exprimiert wird, zum anderen zeigt es dabei deutlich weniger toxische Effekte als bei einer konventionellen Chemotherapie (28). Dennoch kommt es nach Rituximab-Therapie zu Rezidiven und Rituximab-refraktären Erkrankungen. Dies macht die Untersuchung von Resistenzmechanismen und möglichen Kombinationstherapien zur Vermeidung von Resistenzen notwendig (34). Ein konstitutiv-aktivierter PI3K-Signalweg resultierte in einigen Zelllinien im Verlust der Sensibilität gegenüber Rituximab. In diesen Zelllinien konnte die Kombination mit PI3K-Inhibitoren die Zelllinien gegenüber Rituximab wieder sensibilisieren (51).

1.2.4 Obinutuzumab

Das Auftreten von Rezidiven und primär und sekundär Rituximab-resistenten Erkrankungen hat zur Entwicklung neuer monoklonaler Antikörper mit optimiertem Wirkspektrum geführt (28). Obinutuzumab ist der erste humanisierte, mit maßgeschneiderten Zuckerstrukturen modifizierte, Typ-II Anti-CD20-Antikörper (52). In ersten präklinischen Studien konnten Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Wirkung von Obinutuzumab aufgezeigt werden (53). Obwohl sich Typ-I und Typ-II Anti-CD20-Antikörper in den grundlegenden Wirkmechanismen ähneln, sind auch einige Unterschiede der Subtypen bekannt (54). Im Gegensatz zu Typ-I-Antikörpern induziert Obinutuzumab keine komplementabhängige Zytotoxizität (55). Dafür ist der direkte nicht-apoptotische Zelltod stärker ausgeprägt (56). Darüberhinaus verursacht die Glykosylierung der Fc-Region eine Verbesserung der antikörperabhängigen zytotoxischen Wirkungen und zellvermittelter Phagozytose (56). Eine Übersicht über die Unterschiede der Antikörper-Typen zeigt Abbildung 5 (Seite 14). Obinutuzumab induziert nicht-apoptotischen direkten Zelltod. Dieser ist abhängig von Actin-Reorganisation und unabhängig von BCL-2-Überexpression und Caspaseaktivität. Diese Art von Zelltod wird über Actin-Relokalisierung und Lysosomen vermittelt, die ihren Inhalt in das Zytoplasma freisetzen und dadurch zur Lyse der Zelle führen (56). Es kommt hierbei zu der Entstehung sogenannter reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) (57). Die Überlegenheit von Obinutuzumab in der Induktion direkt zytotoxischer Mechanismen konnte sowohl in der Zellkultur als auch Xenograft Modellen gezeigt werden (58). Im Follikulären Lymphom induzierte eine Obinutuzumab-basierte Immunochemotherapie eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens nach 3 Jahren im Vergleich zu Rituximab und Chemotherapie (59). Allerdings zeigte sich nach Obinutuzumab-Therapie auch eine höhere Anzahl unerwünschter Nebenwirkungen (60). Im DLBCL zeigte Obinutuzumab in Kombination mit CHOP keinen Vorteil im Bezug auf progressionsfreies Überleben gegenüber dem R-CHOP-Regime (61).

Vergleich von Typ-I und Typ-II monoklonalen Antikörpern	Typ-I (Rituximab, Ofatumomab) Klasse-I-Epitop	Typ-II (Obinutuzumab, Tositotumomab) Klasse-II-Epitop
Relokalisierung von CD20 in „lipid rafts“	+	-
Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC)	+	-
Homotypische Adhäsion	-	+
Programmierter direkter Zelltod (PCD)	Mögl. Caspase-abhängig	reactive oxygen species, „lysosomal“
Antikörpervermittelte zellabhängige Zellyse/ Phagozytose (ADCC/ADCP)	+	+(+)

Abb. 5: Unterschiedliche Charakteristika von Typ-I und Typ-II Anti-CD20-Antikörpern. Modifiziert nach (54).

1.3 Gezielte molekulare Therapie des PI3K-Signalweges

Zur Entwicklung einer malignen Zelle müssen eine Reihe von Sicherheitsmechanismen überwunden werden (62). Die Zelle muss den programmierten Zelltod entgehen, um den Entzug von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen zu überleben (63). Sie muss DNA-Kontrollpunkte überwinden um vorhandene Mutationen zu fördern und neue Mutationen entstehen zu lassen (64). Und sie muss eine hohe Proteinsynthese aufrechterhalten um den Anforderungen einer schnellen Zellteilung gerecht zu werden (65). Der PI3K-Signalweg reguliert viele Prozesse, die unabdingbar für das Überleben von Tumorzellen sind. Diese umfassen Proliferation, Überleben, Wachstum und Motilität (66). Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist ein Schlüsselregulator unter zellulärem Stress. Da Tumorzellen zellulärem Stress ausgesetzt sind, spielt dieser Signalweg eine wichtige Rolle für das Überleben von Krebszellen (67). Die Rolle dieses Signalweges in der Onkogenese wurde ausgiebig untersucht und Mutationen oder veränderte Expression von Komponenten des Signalweges wurde in der Entstehung von Tumoren nachgewiesen (68). Die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) ist eine bedeutende Signalkomponente downstream von Wachstumsfaktorrezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) (69). Neben RTK können auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren PI3K aktivieren. Die Bedeutung dieser Prozesse in Tumorzellen ist allerdings noch wenig untersucht (66). Die PI3-Kinase katalysiert die Produktion des second messengers PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat). PIP3 wiederum beeinflusst und

aktiviert eine Reihe weiterer Effektormechanismen, wie das Schlüsselenzym AKT (69). Die PIP-3 Produktion wird streng reguliert insbesondere von PTEN. PTEN katalysiert die Umsetzung von PIP3 in PIP2 und inhibiert dadurch den PI3K-Signalweg (70). AKT wiederum reguliert ein großes Spektrum weiterer nachgelagerter Signalkaskaden (vgl. Abb. 6, Seite 15) (66).

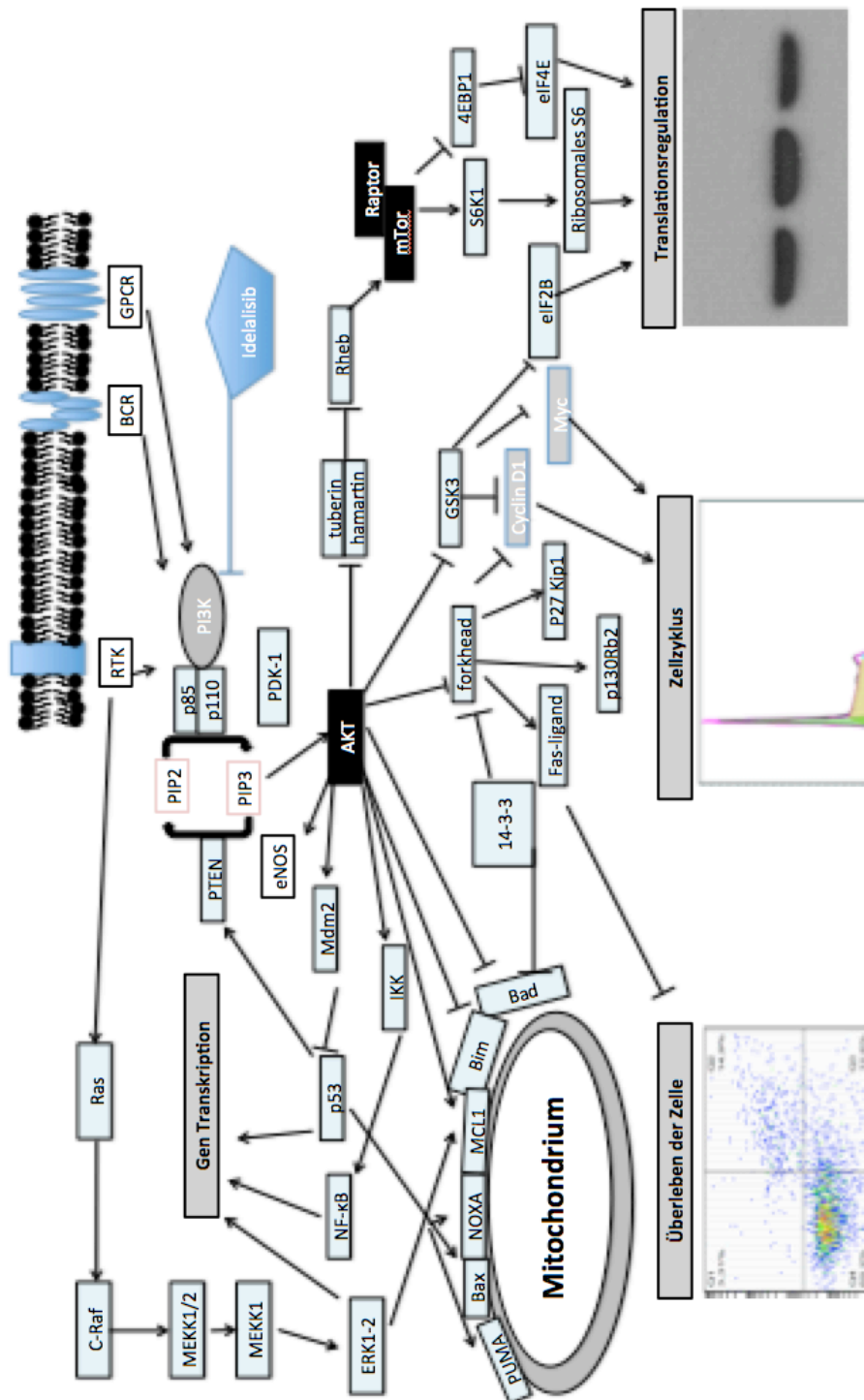


Abb. 6: Übersicht über den PI3K-Signalweg.

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg reguliert das Überleben der Zelle über mehrere Mechanismen (66). Forkhead, ein Mitglied der FOXO-Familie, beeinflusst pro-apoptische Komponenten wie BIM und Fas-Ligand. Darüberhinaus beeinflusst AKT den NF- κ B-Signalweg und trägt dadurch indirekt zum Überleben der Zelle bei. Es besteht eine reziproke Regulation zwischen dem PI3K-AKT-Signalweg und dem Tumorsuppressor p53. Zum einen wird die Transkription von PTEN durch p53 beeinflusst. Zum anderen kann AKT über mdm2 das p53 Protein negativ regulieren (66). Neben der Beeinflussung des Überlebens beeinflusst PI3K/AKT, auch die Zellzyklusprogression, insbesondere den Übergang von G1- zur S-Phase des Zellzyklus (66). AKT phosphoryliert und inhibiert GSK3. Die Kinase GSK3 phosphoryliert und degradiert Cyclin D1 und Myc. Beide Proteine fördern den Übertritt in die S-Phase der Zellteilung (66). Die FOXO-Transkriptionsfaktoren wiederum hemmen Cyclin D1 und fördern die Zellzyklusinhibitoren p27kip1 und p130Rb2 (73). Ein weiterer wichtiger Signalweg, der von PI3K/AKT beeinflusst wird ist, der mTOR-Signalweg (69). Diese beiden Signalwege zeigen ausgeprägte Verbindungen und können als ein Signalweg betrachtet werden (67). mTOR ist eine Serin/Threoninkinase, die ubiquitär exprimiert wird. mTOR integriert Stimuli wie Nährstoffaufnahme und Wachstumsfaktoren, reguliert eine Reihe weiterer Proteine direkt und beeinflusst die Proteinsynthese. Downstream von mTOR befinden sich die Effektoren 4EBP1 und p70S6. Diese spielen eine Rolle in der Initiation der Translation von mRNAs, die für Zellwachstum, Zellzyklusprogression und Zellmetabolismus benötigt werden. Genetische Mutationen, Amplifikationen und Verluste von Schlüsselenzymen konnten in einer Reihe von Malignitäten nachgewiesen werden. Die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges stört die Kontrolle von Wachstum und Überleben der Zellen und führt schließlich zu einem Wachstumsvorteil, metastatischer Kompetenz, Angiogenese und Therapieresistenz (67). Proteine des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges sind ideale Ziele für die Tumorthherapie aus mehreren Gründen. Zum einen inhibiert dieser Signalweg viele Tumorsuppressoren, wie FOXO, Bad, GSK und der Tuberin/Hamartin-Komplex (66), zum anderen handelt es sich bei vielen dieser Proteine um Kinasen. Diese

sind ideale Ziele für molekulare Inhibitoren (66). Drittens konnte gezeigt werden, dass die PI3-Kinase in einer großen Anzahl verschiedener Malignomentitäten dereguliert ist. Medikamente, die diesen Signalweg inhibieren, könnten daher bei einer Vielzahl von Entitäten wirksam sein (66). Die onkogenetische Aktivierung der PI3-Kinase erfolgt über eine Vielzahl von Mechanismen. Hierzu gehört die Mutation oder Amplifikation des PIK3CA-Gens, aktivierende Mutationen der RTK, Mutationen „downstream“ von AKT sowie inaktivierende Mutationen oder Verlust der PTEN-Kinase (74). Auch bei der Onkogenese von hämatologischen Malignitäten spielt PI3K eine Rolle (74). Abbildung 7 zeigt häufige Mutationen des PI3K-Signalweges in hämatologischen Malignomen (74).

Erkrankung	Ort	Häufigkeit
Akute myeloische Leukämie	FLT3	40%
	RAS	18%
	KIT	2-25%
Chronische myeloische Leukämie	BCR-ABLI	95%
Akute lymphatische Leukämie	BCR-ABL1	8% (T-ALL) 25% (B-ALL)
	PTEN	Deletionen 9-17% (T-ALL) Mutationen 8% (T-ALL)
Non-Hodgkin-Lymphome	PTEN	37% (DLBCL) 19% (MCL)
	PIK3CA	8% (DLBCL) 68% (MCL)

Abb. 7: Übersicht über aktivierende Mutationen des PI3K-Signalweges in hämatologischen Malignomen. Modifiziert nach (74).

Der Verlust von PTEN findet sich in 37% der DLBCL. Mutationen die PIK3CA betreffen immerhin in 8% der DLBCL (74). PTEN-Verlust definiert eine Subgruppe von GCB-DLBCL, die konstitutiv aktivierte PI3K-Signalwege besitzen und dadurch sensibel gegenüber PI3K-Inhibition reagieren (75). Die Signifikanz des aktivierten PI3K-Signalweges konnte in ABC-DLBCL-Zelllinien gezeigt werden. Chronisch aktive B-Zell-Rezeptoraktivität verursacht die konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Signalweges und ist eine Gemeinsamkeit der ABC-DLBCL-Subgruppe. In Zelllinien mit CD79B Mutation (18% der Patienten) konnte die konstitutive Aktivität von PI3K und der Kinase PDK1 als essentiell für das Überleben von diesen Zelllinien gezeigt werden. Dies

demonstriert die bedeutende Rolle der PI3K-PDK1-Signaltransduktion in DLBCL und der Untergruppe von ABC-DLBCL Zelllinien und bildet die Grundlage für den Einsatz von PI3K-Inhibitoren in der Therapie des DLBCL (76).

1.3.1 Pan-PI3K-Inhibitor LY294002

Die ersten Substanzen, die als Inhibitoren der PI3-Kinase identifiziert wurden, waren Wortmannin und Qercetin (77). Qercetin, ein natürlich vorkommendes Bioflavinoid, wurde als natürliche Substanz mit inhibitorischer Wirkung auf den PI3K-Signalweg identifiziert (78). Allerdings wirkte Qercetin unspezifisch auf weitere Proteinkinasen. Im Jahre 1994 wurde erstmals LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) beschrieben, ein synthetisches Flavon basierend auf der chemischen Struktur von Qerceptin. Auch LY294002 inhibierte die PI3-Kinase (78). In den folgenden Jahren dienten Wortmannin und LY294002 als geläufige Hilfsmittel für Studien zur Untersuchung des PI3K-Signalweges (79). Dennoch ist der klinische Einsatz von LY294002 durch die relativ schwache Wirkung im mikromolaren Bereich sowie zahlreiche unspezifische Zielstrukturen limitiert (77).

1.3.2 Selektiver PI3K δ -Inhibitor Idelalisib

Der klinische Einsatz molekularer Inhibitoren des PI3K-Signalweges wurde bislang durch die bedeutsame Rolle der PI3-Kinase in der Regulation physiologischer Prozesse limitiert. Die Identifikation von PI3K δ als spezifische Unterform in hämatopoetischen Malignomen eröffnete ein neues Ziel für molekulare Inhibitoren (80). B-CLL-Zellen exprimieren PI3K δ . Der Inhibitor Idelalisib führte zur Inhibition von PI3K δ und induzierte Caspase-abhängige Apoptose in Tumorzellen, nicht jedoch in physiologischen Zellen (80). Der selektive PI3K δ -Inhibitor Idelalisib ist der erste orale, molekulare Inhibitor, der klinisch bei Rezidiven oder therapierefraktären indolenten NHL eingesetzt wird. Idelalisib wurde als Monotherapie oder in Kombination mit Rituximab, Bendamustin oder Rituximab + Bendamustin *in vivo* untersucht. Bei stark vorbehandelten Patienten induzierte Idelalisib eine anhaltende Antitumoraktivität

und verbesserte die Lebensqualität unter Therapie (81). Idelalisib zeigte dabei ein akzeptables Nebenwirkungsprofil, auch wenn Fälle mit tödlicher Diarrhö/Kolitis, Hepatotoxizität, Pneumonitis und intestinalen Perforationen auftraten (52). Insbesondere Patienten, die auf Chemoimmunotherapie nicht ansprachen oder nicht tolerierten, können von Idelalisib profitieren. Derzeit werden eine Reihe klinischer Studien durchgeführt um Idelalisib in Mono- und Kombinationstherapie weiter zu untersuchen (81).

2. Ziel dieser Arbeit

Das DLBCL ist ein hochaggressives, aber heilbares Lymphom. Dennoch rezidiert eine signifikante Anzahl an Patienten und diese zeigen eine schlechte Prognose. Die Entwicklung von Rituximab-resistenten Rezidiven machen neue Therapiestrategien notwendig. Neue molekulare Inhibitoren wie Idelalisib stellen eine Erweiterung der Therapiemöglichkeiten dar. Darüberhinaus stellt die Entwicklung von neueren Anti-CD20-Antikörpern wie Obinutuzumab eine weitere Therapiealternative dar. Der Einsatz neuer Medikamente wirft die Frage der Kombinierbarkeit dieser neuen Substanzen mit den etablierten Therapien auf.

Diese experimentelle Arbeit hatte das Ziel den Einfluss der Monotherapien der beiden Anti-CD20-Antikörper Rituximab und Obinutuzumab sowie der PI3K-Inhibitoren Idelalisib und LY294002 *in vitro* auf Viabilität, Zellzyklus, Apoptose und Veränderung intrazellulärer Signalwege zu untersuchen.

In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss der Kombinationstherapie von Anti-CD20-Antikörper und PI3K-Inhibitoren untersucht. Hierzu wurden mehrere ABC- und GCB-DLBCL-Zelllinien verwendet.

3. Materialien

3.1 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden entweder kommerziell erworben von ATCC® (American Type Culture Collection), von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig, Deutschland) oder direkt von den erstbeschreibenden Forschern freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die folgenden Informationen wurden den ATCC-, DSMZ-Datenbanken und den angegebenen Publikationen entnommen.

Zelllinie	DB	HBL-1	HT	SU-DHL4	SU-DHL5	U2932	Ula	Will-2
	ATCC® CRL-2289™		ATCC® CRL-2260™	ATCC® CRL-2957™	ATCC® CRL-2958™	ACC 633 DSMZ	ACC 627 DSMZ	ACC 652 DSMZ
Subtyp	GCB	ABC	GCB	GCB	GCB	ABC	GCB	GCB
Etabliert	1990	1984	1983	1976	1978	1996	2002	2008
Geschlecht	m	m	m	m	w	w	m	w
Alter	45	65	70	38	17	29	57	63
Entnahme	A	P	A	A	A	A	A	A
CD20	+	+	+	+	+	+	+	-
t(14;18)	-	-	n.a.	+	-	-	+	+
Referenz	(82)	(83)	(82)	(84-87)		(88, 89)	(90)	(91)

A = Aszites; P = Pleura

3.2 Inhibitoren

Alle Inhibitoren wurden zu den angegebenen Konzentrationen in DMSO bei -20°C entsprechend den Angaben des Herstellers gelagert.

Name	Struktur	MW	Stock	Ziele	Hersteller	Ref.
Idelalisib (CAL101)	<chem>C22H18FN7O</chem>	415.42	10mM	p110δ	SelleckChem	(80, 92)
LY294002	<chem>C19H17NO3</chem>	307.34	10mM	PI3Kα/δ/β	SelleckChem	(93, 94)

3.3 Lösungen, Puffer und Antikörper

3.3.1 Allgemeines

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Verbrauchsmaterialien kommerziell von Sigma-Aldrich (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), Serva (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland), Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) oder der Apotheke des Klinikums Großhadern (München, Deutschland) erworben.

3.3.2 Anti-CD20-Antikörper

Antikörper	Hersteller
Obinutuzumab (GA-101)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
Rituximab	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland

3.3.3 Antikörper für Western Blot

3.3.3.1 Primäre Antikörper

Hersteller	Antigen	Art. Nr.	Spez.	Dilution
Cell Signaling Technology Cambridge, UK	AKT	9272	Anti-rabbit	1:2000
	Bax	2772	Anti-rabbit	1:1000
	Caspase 3	9665	Anti-rabbit	1:1000
	Caspase 9	9502	Anti-rabbit	1:1000
	mTOR	2983	Anti-rabbit	1:2000
	p-AKT (Serin 473)	4058	Anti-rabbit	1:500
	PI3K p110 α	4255	Anti-rabbit	1:1000
	PI3K p110 β	3011	Anti-rabbit	1:1000
	PI3K p110 γ	5405	Anti-rabbit	1:1000
	PI3K p110 δ	34050	Anti-rabbit	1:1000
	p-mTOR (Serin 2448)	2971	Anti-rabbit	1:500
	p-p38 (Thr.180/Tyr.182)	4631	Anti-rabbit	1:500
	p-p42/44 (Thr.202/Tyr204)	4377	Anti-rabbit	1:500
	p-PDK1 (Ser.241)	3061	Anti-rabbit	1:500
SantaCruz Heidelberg, Deutschland	GAPDH	SC32233	Anti-mouse	1:50.000
Sigma-	Actin	A2066	Anti-rabbit	1:20.000

Aldrich Deisendorf, Deutschland	BCL2	B3170	Anti-mouse	1:1000
---------------------------------------	------	-------	------------	--------

3.3.3.2 Sekundäre Antikörper

Hersteller	Antikörper	Art. No.	Spezifikation
Cell Signaling Technology Cambridge, UK	Anti-rabbit IgG	7074	HRP-linked
	Anti-mouse IgG	7076	antibodies

3.3.4 Fertigreagensysteme

Reagenssystem	Hersteller
WST-1 Cell Proliferation Assay	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit 1	BD Pharmingen GmbH, Heidelberg, Deutschland

3.3.5 Lysepuffer

Bezeichnung	Selbst hergestellt aus:	
Lysispuffer für PI-Staining	Natriumcitrat	100 mg
	Triton X-100	100 µl
	Propidiumiodid	2 mg
	Aqua purificata	ad 100 ml
	pH 8.0 mit HCl	
Proteinlysispuffer für Western Blot	Tris	100 mM
	Glycerol	20%
	SDS	4%
	Mercapthoethanol	10%

3.3.6 Pufferlösungen

Bezeichnung	Selbst hergestellt aus:	
Albumin-Fraktion V, 5% gelagert bei 4, 4°	Albumin FraktionV (Roth 8076)	5 g
	TBST	100 ml
	Natriumazid	Spatelspitze
ECL	SA	3 ml
	SB	0,3 ml
	H ₂ O ₂	0,9 µl

G-NET	10x NET Gelatine (lösen durch Hitze) Aqua purificata	500 ml 12,5 g ad. 5 l
Milch, 5%	Milchpulver (ROTH T145.2) TBST	5 g 100 ml
NET-Puffer, 10x	Natriumchlorid Na ₂ -EDTA Tris Triton X-100 Aqua purificata	438,3 g 93,6 g 302,85 g 25 g AD. 5 l
SA, gelagert bei 4°C	Luminol 1,5M Tris pH 8,8 AD	100 mg 26,67 ml 373,3 ml
SB, gelagert bei RT, lichtgeschützt	Para-Hydr. Couramin Acid DMSO	44 mg 50 ml
SDS-PAGE Elektrophorese Puffer, 10x	Tris Glycin SDS Aqua purificata	150 g 720 g 50 g ad. 5 l
Stripping-Puffer	eta-Mercaptoethanol 1M Tris-HCl – Puffer pH6,6 SDS (20% w/v) Aqua purificata	360 µl 2,5 ml 4 ml ad 40 ml
TBS, pH 8,0 ; 10x	Tris Natriumchlorid Aqua purificata (pH wurde mit HCl eingestellt)	2,11 g 87,66 g ad. 1 l
TBST	AD 10x TBS (8.0) TWEEN	900 ml 99 ml 1 ml
Tris-HCl , 1,5M, (pH8,8 oder pH6,8)	Tris Aqua purificata (pH wurde mit HCl eingestellt)	908 g ad. 5 l
Western Blot Transfer- Puffer	Tris Glycin Methanol Aqua purificata	15,15 g 75 g 1 l ad. 5 l

3.3.7 Reagenzien

Bezeichnung	Art. Nr.	Hersteller
Bromphenolblau	B-8026	Sigma-Aldrich, Deisendorf, Deutschland
Couramin Acid	C9008	Sigma-Aldrich, Deisendorf, Deutschland
DMSO	472301	Sigma-Aldrich, Deisendorf, Deutschland
H ₂ O ₂ , 4°C	H-0904	Sigma-Aldrich, Deisendorf, Deutschland
Isopropanol	818766	Merck, Darmstadt, Deutschland
Luminol	A4685	Sigma-Aldrich, Deisendorf, Deutschland
Mercaptoethanol	63689	Sigma-Aldrich, Deisendorf, Deutschland

3.3.8 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Art. Nr.	Hersteller
Hybond-LFP Membranen	RPN303F	Sigma-Aldrich, Deisendorf, Deutschland
Whatman Gel blotting paper	GB003,10426890	Sigma-Aldrich, Deisendorf, Deutschland
Gel Saver Tips	I1022-0600	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland
Biotynilated Protein Ladder	7727	Cell Signaling Technology Cambridge, UK
Entwicklungsfilme	CEA-Blaufilm	Fisher/Wehner

3.3.9 Western Blot-Gele

Bezeichnung	Selbst hergestellt aus:		Hersteller
Sammelgel für Western Blot (für 10mL = 4 Membranen)	AD	7,25 ml	ROTH (3029;4°C)
	Acrylamid (30%)	1,7 ml	
	1,5M Tris (pH 6,8)	0,8 ml	Apotheke-Großhadern
	10% SDS	0,1 ml	SIGMA (L4509;RT)
	10% APS	0,1 ml	SIGMA (A3678;-20°)
	TEMED	0,01 ml	SIGMA (T-7024;4°)
Trenngel für Western Blot (für 50 ml = 4 Gele; für 10% Acrylamid Gele)	AD	19,8 ml	ROTH (3029;4°C)
	Acrylamid (30%)	16,7 ml	
	1,5M Tris (pH 8.8)	12,5 ml	Apotheke-Großhadern
	10%SDS	0,5 ml	SIGMA (L4509;RT)
	10% APS	0,5 ml	SIGMA (A3678;-20°)
	TEMED	0,02 ml	SIGMA (T-7024;4°)

3.3.10 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Art. Nr.	Hersteller
DMSO (Vol. 100ml) (Dimethylsulfoxid)	P60-36720100	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Fötales Kälber Serum (FCS),steril filtriert, Herkunft: Südamerika	P30-3702	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10.000 U Pen/ml; 10mg Streptomycin/mL	P06-07025	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
RPMI-1640, Vol: 500 ml L-Glutamine mit 2,0 g/l NaHCO ₃	P04-22100	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
IMDM (Vol: 500ml) Iscove's Modified Dulbecco's Media	P04-20256	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Heparin		Apotheke des Klinikums Großhadern, München
Vi-Cell™ Cleaning Agent	NC9146741	BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA
Vi-Cell™ Buffer Solution	Part 383202	BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA
Vi-Cell™ Trypanblau	Part 383200	BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA
Vi-Cell™ Desinfektant	Part 383201	BeckmanCoulter, Fullerton, CA, USA

3.4 Hilfsmittel und Geräte

Gerät	Hersteller
Blockthermostat BT1302	HLC Biotech, Bovenden, Deutschland
Zentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CO ₂ -Incubator	Sanyo, Moriguchi, Japan
CO ₂ -Wärmeschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
EcoSys FS1030D Elisa- Plate Reader	Kyocera, Kyoto, Japan
FACS Calibur	BD Pharmingen, San Jose, USA
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Power Pac3000, Trans-Blot SD	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Premium Kühlschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Roller Mixer SRT6	Stuart, Staffordshire, UK
Sicherheitswerkbank BDK Laminar Flow	Faust, Schaffhausen, Schweiz
Vi-cell™ XR	Beckmann-Coulter, Fullerton, CA, USA

3.5 Software und EDV

Programm	Entwickler
MS-Word für Mac 2011, v.14.7.7	Microsoft (Redmond, WA, USA)
MS-Powerpoint für Mac 2011, v14.7.7	Microsoft (Redmond, WA, USA)
Endnote X7.7	Thompson ISI Researchsoft (Carlsbad, CA, USA)
Flow Jo, v.10.3	Tree Star Inc. (San. Carlos, CA, USA)

4. Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in 20ml Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) kultiviert. Die Kulturflaschen wurden monatlich durch neue ersetzt.

Die Medien der Zelllinien HT, SU-DHL5, SU-DHL 4, U2932, HBL-1 enthielten 90% RPMI 1640 und 10% steril filtrierte Fötale Kälber Serum (FCS), während die Medien der Zelllinien Ula und DB 20% FCS erhielten. Hitzeempfindliche Komponenten des Komplementsystems im FCS wurden durch Inkubation im Wasserbad (56°C) inaktiviert.

Die Zelllinien wurden gemäß ihres individuellen Wachstumsverhaltens, alle 2-3 Tage auf 0,3 - 0,6 x 10⁶ Zellen resuspendiert. Zellzahl und Viabilität wurden mittels Trypanblau-Ausschlusstests und durch lichtmikroskopische Kontrollen (Vergrößerung 25-100x) überwacht.

In regelmäßigen Abständen wurden die mitochondrialen Polymorphismen der Zelllinien überprüft um mögliche Verunreinigungen und Kreuzkontaminationen auszuschließen. Kontaminationen durch Mykoplasmen wurden mittels kommerzieller Mycoplasmen-Tests überprüft.

Zur Gefrierlagerung wurden 10 Millionen Zellen durch Zentrifugation (300G, 10min, 4°C) und Abgießen des Überstandes unter sterilen Bedingungen isoliert und in vorgekühlter Lösung aus 90% FKS und 10% DMSO resuspendiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen bei -80°C gelagert und teilweise in flüssigen Stickstoff (-180°C) zur langfristigen Lagerung überführt. Die Versuchszelllinien wurden alle 3 Monate durch so gelagerte Zelllinien ersetzt.

Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen rasch im Wärmebad aufgetaut, in 10 ml Nährmedium überführt und anschließend, um das toxische DMSO schnellstmöglich zu entfernen, zentrifugiert (300G, 10 min, 4°C). Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 20 ml vorgewärmtes Kulturmedium resuspendiert und unter Standardbedingungen kultiviert.

4.1.2 Behandlung von Zellen

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente erfolgten alle nach dem folgenden Schema. Zunächst wurde die Zelldichte der zu testenden Zelllinien mittels Vi-CELL™ XR (kommerziell erhältliches Kit) bestimmt. Anschließend wurde der Verdünnungsfaktor gemäß der Formel $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$ berechnet und die Zelllinien mit vorher angewärmtem Nährmedium auf individuelle Ausgangskonzentrationen in 50 ml Zentrifugenröhrchen, Typ Falcon® verdünnt. Die Zelldichte wurde erneut bestimmt und dieser Wert als t_0 -Ausgangskonzentration dokumentiert. Im nächsten Schritt wurden jeweils 5 ml der Zellsuspension auf 6-Felder-Suspensionsplatten verteilt. Die zu testenden Substanzen wurden mit Nährmedium auf die Ausgangskonzentration verdünnt. Daraufhin wurden die verschiedenen Felder mit den Substanzen und deren Kombinationen behandelt. Die 6-Felder Suspensionsplatten wurden anschließend im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden aus diesen Ansätzen Proben für Viabilitäts-, Apoptose-, Zellzyklus- oder Proteinanalysen entnommen.

4.2 Trypanblau-Ausschlusstest

Neben der mikroskopischen Betrachtung wurden die Vitalität und Zellkonzentration der Zelllinien routinemäßig mittels Trypanblau-Ausschlusstests überwacht (95). Der Farbstoff Trypanblau wird von viablen Zellen aktiv aus der Zelle gepumpt und die Zelle erscheint somit in der Neubauer-Zählkammer und Durchlichtmikroskopie transparent. Apoptotische Zellen verlieren diese Fähigkeit und können somit anhand ihrer Farbstoffaufnahme identifiziert werden. Der Anteil der transparenten Zellen spiegelt somit den Anteil der lebenden Zellen wieder (96). Die Zelldichte wird mittels Neubauer-Zählkammer in 4 Großquadranten ermittelt. Zur Bestimmung der Zelldichte der Suspension wurde diese 1:1 mit Trypanblau verdünnt und mittels der Formel $(N1) = (N2/2) \times 10^4$ berechnet.

N1= Zellzahl in den 4 Quadranten. N2=Zellzahl pro ml Zellsuspension.

4.2.1 Vi-CELL™ Zellquantifizierung

Das vollautomatische Vi-CELL™ XR von Beckman Coulter vereinfacht die routinemäßige Überwachung der Zelllinien und ermöglicht die Ermittlung antiproliferativer Effekte von Substanzen. Mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstests ermittelt das Vi-CELL™ XR die Vitalität, Zellzahl, Durchmesser und andere Faktoren einer Probe. Hierfür werden 500 µl einer zu untersuchenden Probe analysiert. Nach Kalibrierung des Gerätes werden die Proben angefärbt, durch ein Durchflussszytometer geschickt und 50 digitale Messungen erstellt. Diese werden durch das Gerät ausgewertet. Dabei wird die Leuchtdichte der einzelnen Pixel bestimmt und ein Wert zugewiesen. So kann das Gerät zwischen angefärbten (tot) und ungefärbten (vital) Zellen unterscheiden (97).

4.2.2 Extraktion mittels Dichtegradientenzentrifugation

Mittels der Dichtegradientenzentrifugation können Blutproben anhand ihrer Schwebedichte aufgetrennt werden. Zur Separation von Lymphozyten wird hierfür das synthetische Polysaccharid Ficoll modifiziert nach Herstellerprotokoll (98) verwendet. Zunächst wurde mittels peripherer Venenpunktion Blut von gesunden Spendern (nach Einwilligung der Probanden) entnommen und mittels 33% Plasmasteril durch Sedimentation die Erythrozyten entfernt. Das Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit RPMI verdünnt und in 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde sterile Ficoll-Lösung in einem Zentrifugenröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit dem verdünnten Blut im Verhältnis 1:2 beschichtet. Durch 30 minütige Zentrifugation (1g) ohne Bremse bei Raumtemperatur wurde das Blut anhand der Sedimentation in einem Dichtegradienten in die verschiedenen Bestandteile separiert. Mit einer Pipette wurde anschließend der „buffy coat“ (wolkige weiße Zellschicht), der die Lymphozytenfraktion des Blutes darstellt, in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde anschließend zweimal mit RPMI aufgefüllt und zentrifugiert (300G, 10min, 4°C) um möglichst viel des restlichen Ficoll zu entfernen. Letztlich wurde das Pellet in sterilem PBS gelöst. Um möglichst viel Material zu gewinnen wurde die Zellzahl im Verhältnis 1:100 in PBS verdünnt mittels Vi-CELL™ XR bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt konnten

RNA oder Proteinproben entnommen werden. Sollen unspezifische toxische Nebenwirkungen der Medikamente auf Lymphozyten allgemein untersucht werden, werden die hier gewonnen Zellen verwendet. Zur weiteren Differenzierung können B-Lymphozyten durch CD20-MicroBeads® (kommerziell erhältliches Kit) von den T-Lymphozyten separiert werden.

4.3 WST-1-Proliferationsassay

Prinzip:

Neben der Bestimmung der Zellzahl stellt der WST-1-Proliferationsassay eine weitere Methode zur Detektion stoffwechselaktiver Zellen dar. Das WST-1 Reagenz wird von stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und das Tetrazoliumsals 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetra- zolol]-1,3-Benzendisulfonat zum ringoffenen Formazansalz metabolisiert (99). Dies bewirkt einen Farbumschlag, welcher mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) quantifiziert werden kann. Das Absorptionsmaximum korreliert dabei mit der Menge stoffwechselaktiver Zellen und wird im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollen gesetzt. Nach dem Massenwirkungsgesetz stellt sich zwischen verschiedenen Stoffen ein dynamisches Gleichgewicht ein. Absorption und Resorption können daher nicht 0 sein. Mit der Verwendung von „blanks“, die Nährmedium mit WST-1 Reagenz entsprechen, wird dieser Effekt herausgerechnet (100).

Versuchsdurchführung:

WST-1-Proliferationsassays wurden mittels Roches's kommerziell erhältliches WST-1 Assay Kit durchgeführt. Gemäß den Instruktionen des Herstellers (101) wurden 50 µl der zu testenden Zellsuspension mit doppelter Konzentration als später erwünscht in 96-Felder-Suspensionsplatten suspendiert, anschließend wurden 50 µl Substanzlösung, ebenfalls in doppelter Konzentration, hinzugegeben und für 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert. Danach wurden mittels Multipipette die Probenfelder mit 10 µl WST-1 Reagenz versetzt und nochmals für 4 Stunden lichtdicht inkubiert. Anschließend wurde die Absorption mittels ELISA Plate Reader gemessen und ausgewertet. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz sollten die Filter zwischen 420 und 480 nm eingestellt sein,

mit maximaler Absorption bei 440 nm. Die Versuche wurden in dreifachem Ansatz durchgeführt. Von den Einzelwerten wird der „blank“-Mittelwert subtrahiert und aus den hieraus gebildeten Werten der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

4.4 Durchflusszytometrie

4.4.1 Funktionsweise

Für die Durchflusszytometrie wurde ein FACS Calibur™ der Firma BD Biosciences verwendet.

Das Durchflusszytometer dient der Charakterisierung von Zellen mittels Laserstrahlung (102). Hierzu werden die Zellsuspensionen unter starker Beschleunigung in die Messküvette gebracht und passieren anschließend zwei Laser (blau: 488nm, rot: 633 nm). Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle, so wird das Licht charakteristisch gestreut. Die Streuung ist abhängig von der Größe der Zelle, der Membranstruktur, sowie intrazelluläre Komponenten. Das gestreute Licht wird von Detektoren aufgezeichnet, hierbei kommt es zu einer Streuung nach vorne (forward light scatter, FSC) und 90° zur Seite (side scatter, SSC). Darüberhinaus besitzt das Gerät die Fähigkeit bis zu 4 weitere Fluoreszenzfarbstoffe zu analysieren.

4.4.2 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid

Prinzip:

Der Zellzyklus unterteilt sich in die Interphase und die Mitose, welche wiederum in G1-, S- und G2-Phase unterteilt werden kann. In den verschiedenen Zellphasen gibt es jeweils Kontrollpunkte, der wichtigste während der G1-Phase, hier wird entschieden ob die Zelle sich weiter differenziert oder erneut in die S-Phase eintritt. In der S-Phase kommt es zur Replikation der DNS. Treten hierbei Fehler auf, können diese während der G2-Phase nochmals kontrolliert werden, erst dann kommt es zur Teilung der Zelle. Propidiumiodid interkaliert mit der DNS und es kann somit der DNS-Gehalt von Zellen ermittelt werden (103).

Versuchsdurchführung:

Zur Analyse des Zellzyklus mit der Propidiumiodid-Färbung wurde die Zellzahl bestimmt und $1-2 \times 10^6$ Zellen für die Analyse entnommen. Die Suspension wurde dann zentrifugiert (5min, 2000 rpm, 4°C) um das Medium zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 1-2 ml PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert (5min, 2000 rpm, 4°C). Daraufhin wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit ca. 1 ml eisgekühltem Äthanol für 30 min auf Eis lysiert. Im nächsten Schritt wurde das Äthanol durch Zentrifugation entfernt (10 min, 2000rpm) und verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde mit PBS gewaschen (2 x 5 min, 2000 rpm) und der Überstand wiederholt verworfen. Um autolytische Prozesse zu unterbinden wurde die Probe mit 50 µl RNase versehen. Es folgte die Färbung und Durchmischung mit 200 µl Propidiumiodid. Die Proben wurden lichtdicht verpackt und mindestens 10000 Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers FACS Calibur analysiert. Anschließend wurden die Ergebnisse mit der Software FlowJo ausgewertet. Zur Darstellung wurde auf der X-Achse die Fluoreszenz-Intensität (FL2) gewählt. Auf der Y-Achse wurde die Anzahl der Zellen eingestellt. Man erhält ein charakteristisches Bild der Zellzyklusverteilung. Der erste Gipfel erfasst Zellen der G1/G0-Phase. Der zweite Gipfel mit etwa doppelt so hoher Intensität erfasst Zellen der G2/M-Phase und die intermediären Zellen entsprechen der S-Phase (104). SubG0/1-Populationen zeigen apoptotische Zellen und wurden nicht berücksichtigt. Bei der Auswertung wurde das Dean-Jett-Fox-Model verwendet. Ein statistisches Verfahren und Weiterentwicklung des Watson-Models, dass sowohl Annahmen über die G1, G2 und S-Phase macht (105). Abb. 8 (Seite 33) zeigt ein charakteristisches Zellzyklusprofil.

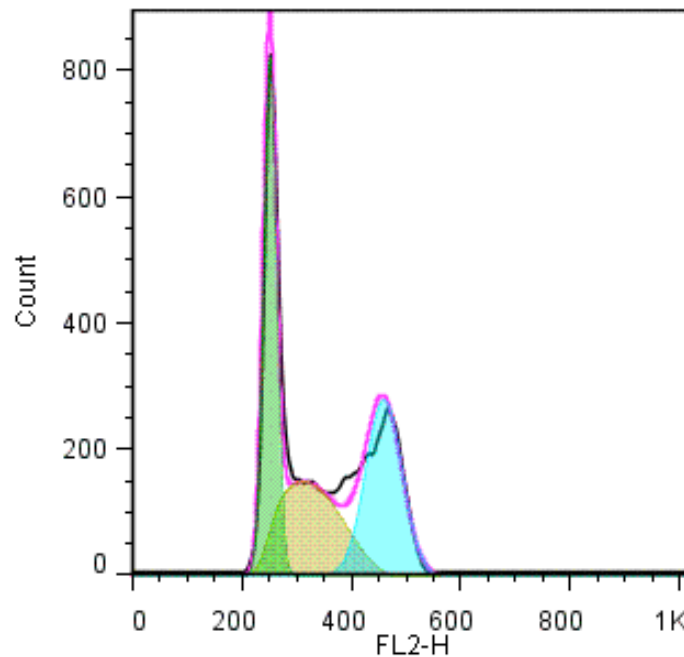


Abb. 8: Charakteristischer Darstellung des Zellzyklus nach Propidiumiodid-Färbung

Zelllinie HBL-1. Der erste Peak entspricht den Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, der zweite Peak entspricht der G2-Phase und intermediäre Zellen der S-Phase des Zellzyklus.

4.4.3 Analyse der Apoptose mit Annexin V-PE/7-AAD-Färbung

Prinzip:

Die Apoptose stellt die programmierte, geregelte Art des Zelltodes dar. Da viele Medikamente über die verschiedensten Mechanismen apoptotische Effekte verursachen oder begünstigen, stellt die Analyse der apoptotischen Effekte eine grundlegende Art der Untersuchung von Medikamenteneffekten dar. Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen einer Kultur wurde das Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I ein kommerziell erhältliches Kit von BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Die frühe Phase der Apoptose zeichnet sich durch den Verlust der Membranintegrität aus. Im Laufe dieses Prozesses wird Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Plasmamembran externalisiert und stellt damit einen geeigneten Marker zur Erfassung apoptotischer Zellen dar (106). Bei Annexin V handelt es sich um ein Ca^{2+} abhängiges Phospholipid-Bindeprotein

mit hoher Affinität zu PS. Annexin V wird hierfür mit Phycoerythrin (PE) gekoppelt um es für die durchflusszytometrische Detektion zugänglich zu machen (107).

Allerdings wird auch im Laufe nekrotischer Zellprozesse PS externalisiert. Im Unterschied zur Nekrose bleibt die Zellmembran bei der Apoptose initial intakt, deshalb muss Annexin V-PE mit einem Vitalfarbstoff kombiniert werden um die Integrität der Zellmembran beurteilen zu können (107). Hierfür kann 7-AAD verwendet werden. 7-AAD zeigt eine gute DNA-Bindung durch Vernetzung von Cytosin und Guanin und wird bei intakter Membran von der Zelle nicht aufgenommen (108). Durch die Kombination der beiden Farbstoffe und Detektion mittels Durchflusszytometrie können frühapoptotische, apoptotische und nekrotische Vorgänge differenziert werden. Es können viable (7-AAD negativ / Annexin V-PE negativ), präapoptotische (7-AAD negativ / Annexin V-PE positiv), apoptotische (Annexin V-PE positiv / 7-AAD positiv) und nekrotische/spätapoptotische Zellen (7-AAD positiv / Annexin V-PE negativ) unterschieden werden (109). Abbildung 9 (Seite 35) zeigt einen repräsentativen Dot-Plot.

Versuchsdurchführung:

Zur Analyse wurden die Zellen wie zuvor beschrieben behandelt und zu definierten Zeitpunkten ca. 1×10^6 Zellen entnommen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4°C), das Medium entfernt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen um möglichst viel Mediumreste zu entfernen. Der Bindungspuffer wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und mit einem Volumen von 500 µl/Probe hergestellt. Zunächst wurden 100 µl des Puffers hinzugegeben. Die unbehandelten Kontrollen wurden einzeln mit Annexin V-PE oder 7-AAD und mit beiden Antikörpern gefärbt. Dies ermöglicht später die Kompensation falsch positiver Zellen. Die behandelten Proben wurden mit jeweils 5 µl beider Färbungen inkubiert. Alle Proben wurden lichtdicht um die UV-sensitiven Farbstoffe zu schonen bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Nach erneuter Zugabe des Bindungspuffers (400 µl) wurden die Proben mittels FACS Calibur analysiert. Hierfür wurde auf der X-Achse Annexin V-PE und auf der y-Achse 7-AAD eingestellt. Zunächst wurden die einfach-gefärbten Kontrollen gemessen und die Laser sowie Kompensation eingestellt. Die vitalen

Zellen kommen im Idealfall als runde Population im linken unteren Quadranten zu liegen. Anschließend wurden die doppelt-gefärbten Kontrollen eingestellt und gemessen. Mit den gleichen Einstellungen wurden nun die restlichen Proben gemessen.

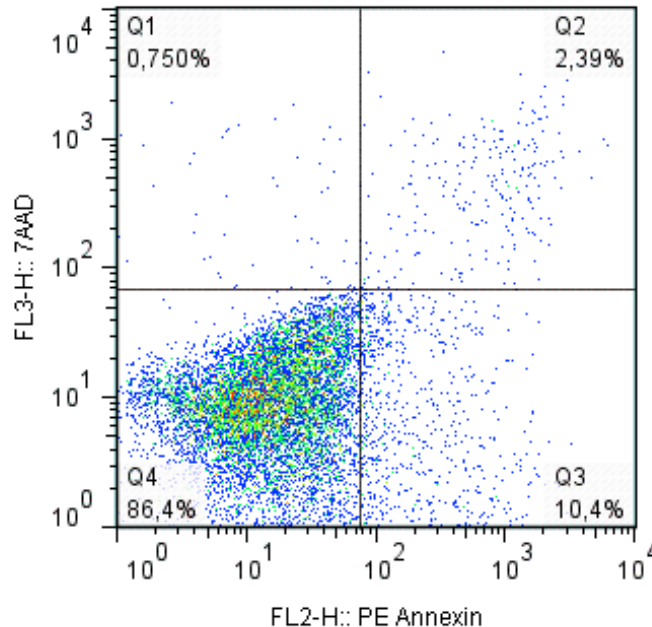


Abb. 9: Charakteristischer Dot-Plot nach Annexin V-PE/7-AAD-Färbung

Zelllinie U2932. Im linken unteren Quadranten zeigen sich viable Zellen, im rechten unteren präapoptotische Zellen, im rechten oberen Quadranten apoptotische Zellen und im linken oberen Quadranten nekrotische/spätapoptotische Zellen.

4.5 Proteinanalyse mittels Western Blot

Prinzip:

Die SDS-Page-Gelelektrophorese erlaubt die Aufteilung von Proteinen gemäß ihrer individuellen Masse entlang eines Spannungsgradienten in einem Polyacrylamidgel. Mittels Western Blot können die aufgetrennten Proteine auf Membranen übertragen werden und anschließend mit Hilfe von Immunodetektion semi-quantitativ analysiert werden. Nach Aufspaltung und Übertragung auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen sind die Proteine für die Bindung von Antikörpern zugänglich. Zunächst wird ein passender primärer Antikörper für das nachzuweisende Antigen inkubiert, anschließend ein für den primären Antikörper passender sekundärer Antikörper appliziert. Dieser bindet

spezifisch die Fc-Region des Primärantikörpers und ist mit HRP (horseradish peroxidase) konjugiert. Die anschließenden Waschschriffe entfernen unspezifisch gebundene Antikörper. Das Enzym HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol. Bei dieser Reaktion wird Chemielumineszenz frei, die auf lichtsensitiven Filmen detektiert werden kann. Dies erlaubt die semiquantitative Beurteilung des Proteingehaltes der untersuchten Proben. Die Beurteilung darf nur im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen und Ladekontrollen erfolgen. Für die Ladungskontrolle wurden die Proteine β -Actin und GAPDH verwendet.

Versuchsdurchführung:

Die Durchführung der Proteinanalysen erstreckt sich über drei Tage. Am ersten Tag werden die für die Elektrophorese benötigten Gele hergestellt. Am 2. Tag werden die Proteine mittels Elektrophorese aufgeteilt und mittels Western Blot auf Nitrozellulose Membranen übertragen. Am Ende des 2. Tages werden die Membranen mit spezifischen primären Antikörpern über Nacht inkubiert. Am 3. Tag schließlich erfolgt die Inkubation des sekundären Antikörpers und Detektion mittels ECL-Reaktion und Röntgenfilmen.

Zur Analyse wurden 10^6 Zellen aus den Proben entnommen und zentrifugiert (3G, 11 min). Nach vorsichtigem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in SDS-Lysepuffer (4% SDS, 100mM Tris, 20% Glycerol, 10% β -Merkaptoethanol) gelöst und über Nacht bei 4°C unter konstanter Rotation lysiert. Die Kühlkette der Lysate wurde hierbei nicht unterbrochen. Anschließend wurden die Lysate mit Bromphenolblau versetzt, durchmischt und bei -20°C bis zur Verwendung eingefroren. Bevor die Proteine geladen wurden erfolgte die Denaturierung im Wärmeblock (5 min, 95°C) und anschließende Lagerung auf Eis. Zur Durchführung der Proteinanalyse wurden zunächst die Vorrichtungen zum Gießen der SDS-Gele vorbereitet. Zwei Glasplatten wurden durch Platzhalter separiert und in die vorgesehene Vorrichtung geschraubt. Anschließend wurden in Zentrifugenröhrchen die Gele gemäß Anleitung gemischt. APS und TEMED wurden zunächst nicht hinzugegeben, da nach Zugabe dieser Stoffe die Polymerisation des Acrylamids gestartet wird. Stehen die fast fertigen Sammelgele, Trenngele und Vorrichtungen bereit, wurde APS und TEMED hinzugegeben, die Zentrifugenröhrchen verschlossen durchmischt

und anschließend die Trenngele zwischen die Glasscheiben pipettiert und mit Isopropanol beschichtet. Das weniger dichte Isopropanol setzt sich über dem Trenngel ab und erzeugt eine glatte Oberfläche des Gels. Nach 30 min ist die Polymerisation der Gele abgeschlossen. Dann wurde zu den vorbereiteten Sammelgelen APS und TEMED hinzugegeben und wieder durchmischt. Danach wurden die Sammelgele auf die Trenngele gegossen und die Kämme zur Aussparung der Ladekammern mit der benötigten Probenzahl eingesteckt. Nach Polymerisation wurden die Gele über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am Tag 2 wurden die fertigen Gele in die Elektrophorese-Vorrichtung eingebaut, die Kämme entfernt und die Vorrichtung mit Elektrophorese-Puffer befüllt. Die „ladder“ ist ein farbiges Gemisch mit der durch eine definierte Farbgebung die Proteingrößen bestimmt werden kann. 10 µl der Ladder wurde in den ersten Slot geladen. Anschließend werden jeweils 10 µl der Proteinlysate in die Gele geladen. Durch Anlegen von Spannung konnten nun die Proteine aufgetrennt werden (30 min bei 61 V, 60 min bei 91 V, 121 V bis die Proteine das Gel durchlaufen haben). Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus der Vorrichtung genommen und die Western Blot-Vorrichtung vorbereitet. Die Membranen wurden durch Methanol aktiviert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Beim Semi-Dry Western Blot wird die Transferzelle zunächst mit Transferpuffer befeuchtet. Die Membran und das Polyacrylamidgel wurden in einem Western Blot Sandwich in der Transferkammer platziert und erneut Transferpuffer hinzugegeben (vgl. Abb. 10, Seite 38).

Western Blot Sandwich

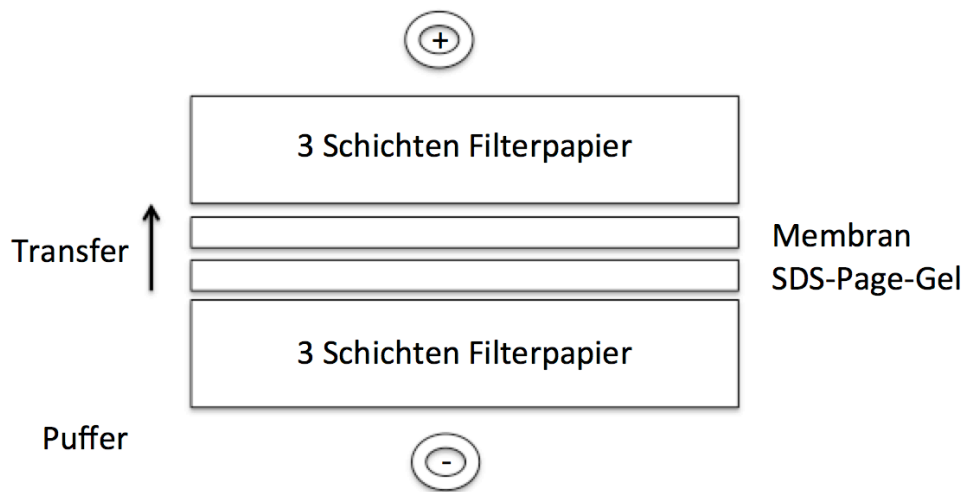


Abb. 10: Aufbau eines Western Blot-Sandwich.

Nach Anlegen der Spannung (20V) wurden die Proteine für 60 min auf die PVDF-Membran übertragen. Danach wurden die Membranen aus der Vorrichtung und dem Sandwich gelöst und nun die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation in Milch (60 min) geblockt. Anschließend wurden die Membranen (3x 5 min mit TBST) gewaschen und mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am 3. Tag wurde der primäre Antikörper durch Waschen der Membranen (3x 5 min in TBST) entfernt. Anschließend wurde der sekundäre Anti-mouse oder Anti-rabbit-IgG, je nach Typ des Primärantikörpers, gelöst in Milch (Verdünnung: 1:20000, 60 min) inkubiert. Nach Entfernen des sekundären Antikörpers wurden die Membranen nochmals gewaschen (3x 5 min in TBST) und auf Klarsichtfolie platziert. Die ECL-Entwicklungslösung wurde hergestellt, auf die Membranen gegeben und 1 min inkubiert. Danach wurde die Entwicklungslösung entfernt, die Membranen in Klarsichtfolie verpackt und in einer Entwicklungskassette fixiert. Nun können in der Dunkelkammer Röntgenfilme belichtet und mit Hilfe einer Entwicklungsmaschine fixiert werden. Dabei erfolgten unterschiedlich lange Belichtungszeiten um eine bestmöglich kontrastierte Darstellung zu erhalten. Die fertigen Filme wurden mittels Scanner digitalisiert und ausgewertet.

4.6 Das „fraction of product“-Konzept

Zur Evaluation der Interaktion mehrerer Therapeutika in Kombinationstherapien wurde das „fraction of product“-Konzept nach Webb verwendet (110). Dieses Konzept beruht auf dem Prinzip, dass jede Zelle nur einmal sterben kann und errechnet nach der Formel:

$$[(1 - \text{FA Substanz A}) \times (1 - \text{FA Substanz B})] - (1 - \text{FA Kombination Substanz A+B})$$

einen Wert, der Auskunft über die Interaktion der Substanzen gibt, auch ohne etwas über den Mechanismus zu wissen. Es wird die Zellzahländerung der behandelten Probe mit der unbehandelten Kontrolle verglichen (fraction affected (FA) = Kontrolle/behandelte Probe). Ein Wert kleiner als -0,1 wird als antagonistisch, zwischen -0,1 und 0,1 als additiv und größer als 0,1 als synergistisch bewertet.

4.7 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mittels Microsoft Excel Tabellen erfasst und ausgewertet. Es erfolgte die Bestimmung von Mittelwerten, Standardabweichungen und p-Werten mittels Kalkulation in Excel. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

5. Ergebnisse

5.1 Wirkung der Anti-CD20-Antikörper

5.1.1 Obinutuzumab induziert homotypische Adhäsion

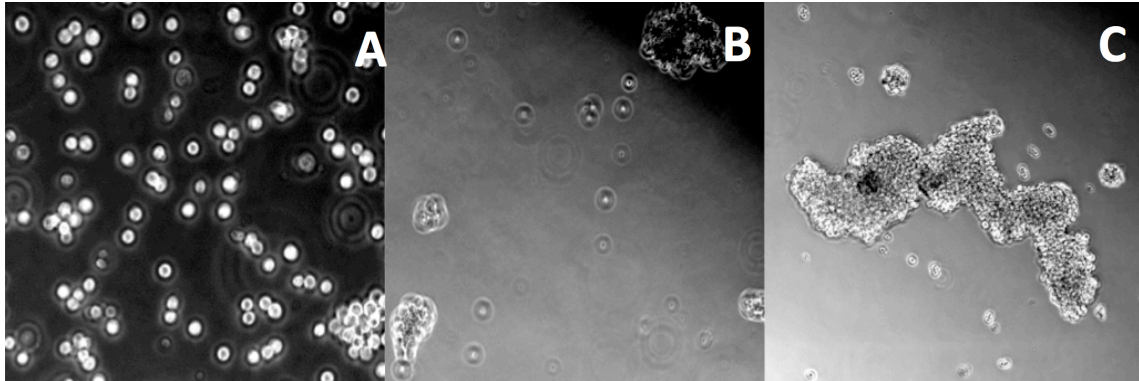


Abb. 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen der DLBCL-Zelllinie U2932

Unbehandelte Kontrolle (A) oder 6 Stunden nach Behandlung mit Rituximab (B) oder Obinutuzumab (C).

Die Zelllinie U2932 wurde mit entweder Rituximab oder Obinutuzumab behandelt und anschließend 6 Stunden inkubiert. Nach Behandlung mit Obinutuzumab zeigten sich schon makroskopisch sichtbare Zellteppiche, die mikroskopisch großen Aggregaten von Tumorzellen entsprechen. Diese aggregierten Zellhaufen wurden in lichtmikroskopischer Vergrößerung mittels Kamera aufgezeichnet. Nach Behandlung mit Rituximab war diese Aggregation von Zellen kaum nachweisbar (vgl. Abb. 11).

5.1.2 Anti-CD20-Antikörper hemmen die Proliferation

Zunächst wurde der Einfluss auf die Zellproliferation der beiden Anti-CD20-Antikörper Rituximab und Obinutuzumab in DLBCL-Zelllinien untersucht. Hierfür wurden 5 „germinal-center-like“-DLBCL-Zelllinien (GCB-DLBCL) (Ula, SU-DHL5, HT, SU-DHL4, Will) und 2 „activated-B-cell-like“-DLBCL-Zelllinien (ABC-DLBCL) (HBL-1, U2932) auf Suspensionsplatten gemäß ihres individuellen Wachstumsverhaltens mit Zellzahlen zwischen $0,3-0,6 \times 10^6$ Zellen suspendiert. Die Zelllinien wurden mit den beiden Antikörpern in Konzentrationen zwischen 1 µg/ml bis 10 µg/ml behandelt und über 72 Stunden inkubiert. Die Zellzahlen

wurden mittels Trypanblau-Ausschlussverfahrens alle 24 Stunden analysiert. Entsprechend der individuellen Proliferationsraten der verschiedenen Zelllinien wurden die Zellzahlen in Bezug zu den unbehandelten Kontrollen gesetzt.

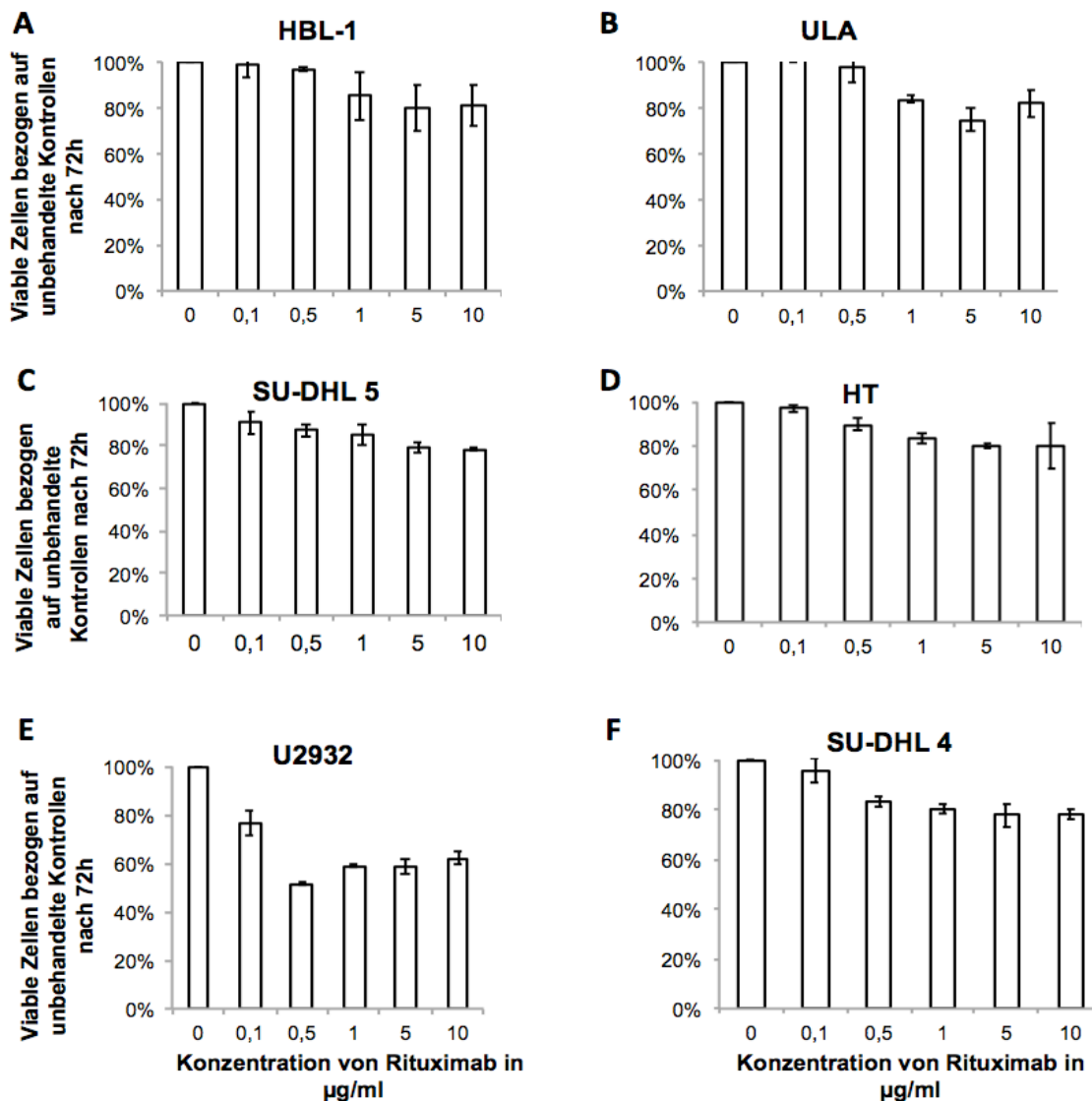


Abb. 12: Konzentrationsabhängige Proliferationshemmung durch Rituximab

6 DLBCL-Zelllinien (A-F) wurden mit steigenden Konzentrationen (0,1 - 10 µg/ml) Rituximab behandelt und für 72 Stunden inkubiert. Die Säulen repräsentieren viable Zellen in Prozent der unbehandelten Kontrolle nach Analyse mit Trypanblau-Ausschlussverfahren. Vertikale Indikatoren zeigen die Standardabweichung. Es wurde 1 Versuch in dreifachem Ansatz durchgeführt. Zelllinie Will-1 vgl. Anhang 1, Seite 93.

Die Anti-CD20-Antikörper zeigten eine zeit- und dosisabhängige Proliferationshemmung (vgl. Abb. 12-14, Seite 41-43). Eine Erhöhung der Dosis über 1 µg/ml führte zu keiner signifikanten Wirkungssteigerung. Für die weiteren

Versuche und Kombinationsexperimente wurde deshalb eine Konzentration von 1 µg/ml festgesetzt.

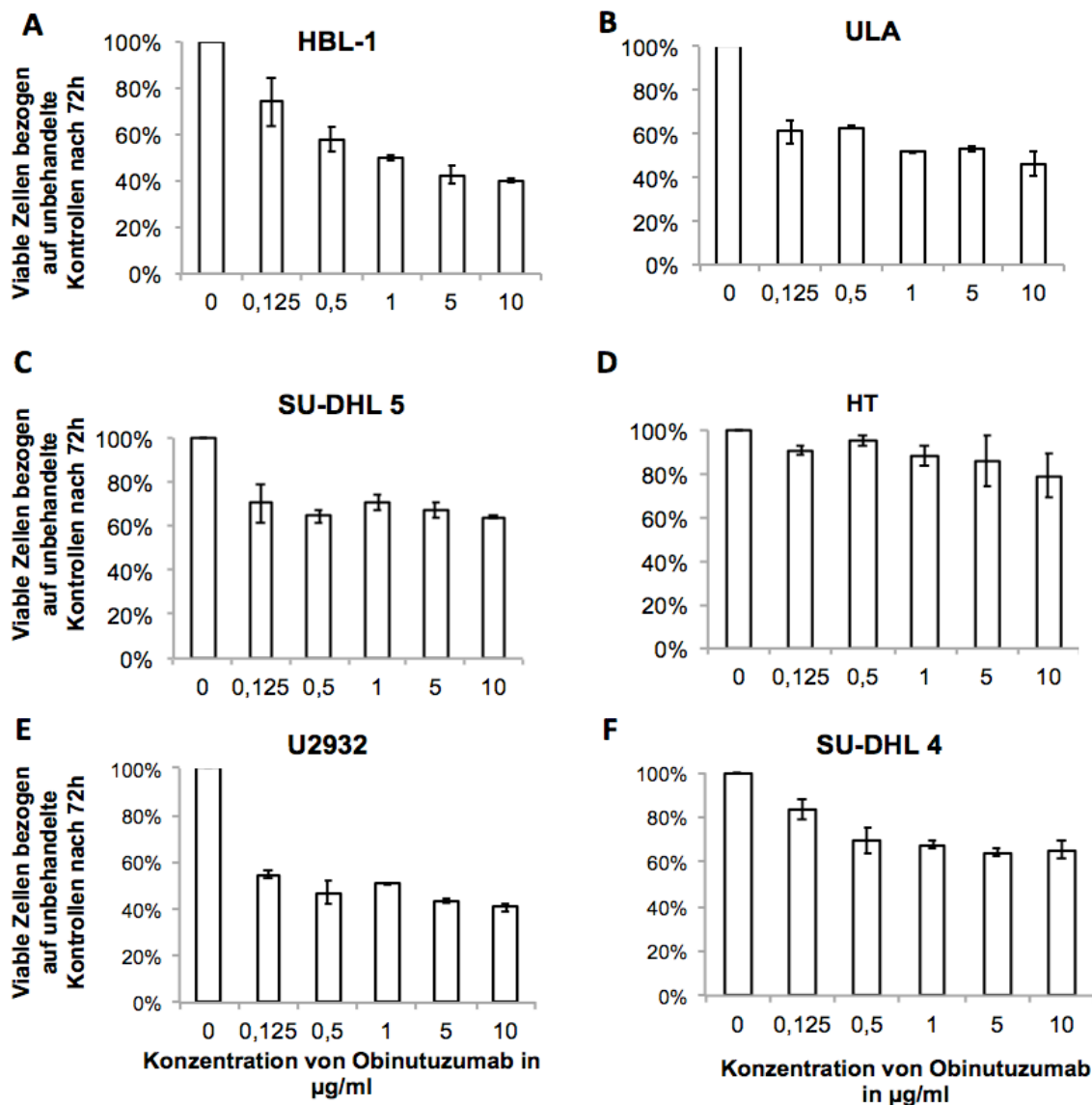


Abb. 13: Konzentrationsabhängige Proliferationshemmung durch Obinutuzumab

6 DLBCL-Zelllinien nach 72 Stunden Inkubation mit Obinutuzumab. Die Säulen repräsentieren viable Zellen in Prozent der unbehandelten Kontrollen. Vertikale Indikatoren zeigen die Standardabweichung. Es wurde 1 Versuch in dreifachem Ansatz durchgeführt. Zelllinie Will-1 vgl. Anhang 1, Seite 93.

Der zeitliche Verlauf der Wirkung wurde untersucht. Beide Anti-CD20-Antikörper reduzierten die Zellzahlen in sensiblen Zelllinien bereits in den ersten 24 Stunden deutlich. Rituximab verursachte keine Progredienz der Zellreduktion über 48 und 72 Stunden.

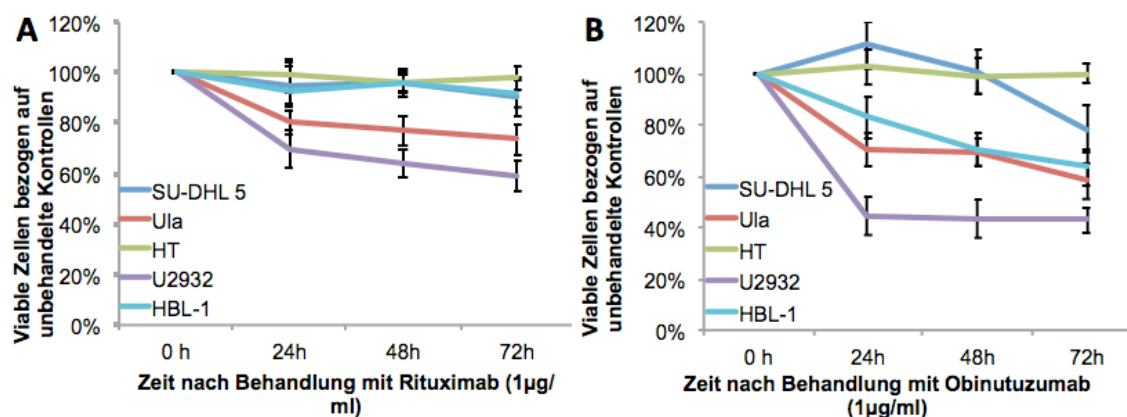


Abb. 14: Zeitabhängige Proliferationshemmung durch Anti-CD20-Antikörper.

5 DLBCL-Zelllinien wurden über 72 Stunden mit 1 µg/ml Rituximab (A) oder Obinutuzumab (B) inkubiert. Die Darstellungen zeigen viable Zellen in Prozent der unbehandelten Kontrollen. Vertikale Indikatoren repräsentieren die Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Obinutuzumab zeigte in den Zelllinien HBL-1, SU-DHL5 und Ula eine progrediente Zellreduktion über 48 und 72 Stunden. Die verschiedenen Zelllinien unterschieden sich hinsichtlich ihrer Sensibilität gegenüber Anti-CD20-Therapie. Beide Antikörper reduzierten die Zellzahl signifikant in 4 bzw. 5 der 7 getesteten Zelllinien. Die Zelllinien Will-1 und HT waren resistent gegenüber beiden Antikörpern.

DLBCL-Zelllinien	RTX (1µg/ml)	OTM (1µg/ml)	p-Wert (RTX:OTM)
ULA	77 (+9)	59 (+7)	<0,001
SU-DHL 5	90 (+8)	78 (+9)	0,422
U2932	59 (+7)	43 (+6)	<0,001
HT	98 (+5)	100 (+4)	0,194
HBL-1	92 (+8)	65 (+9)	0,021
SU-DHL 4	72 (+6)	80 (+9)	0,901
Will-2	97 (+3)	98 (+5)	0,666

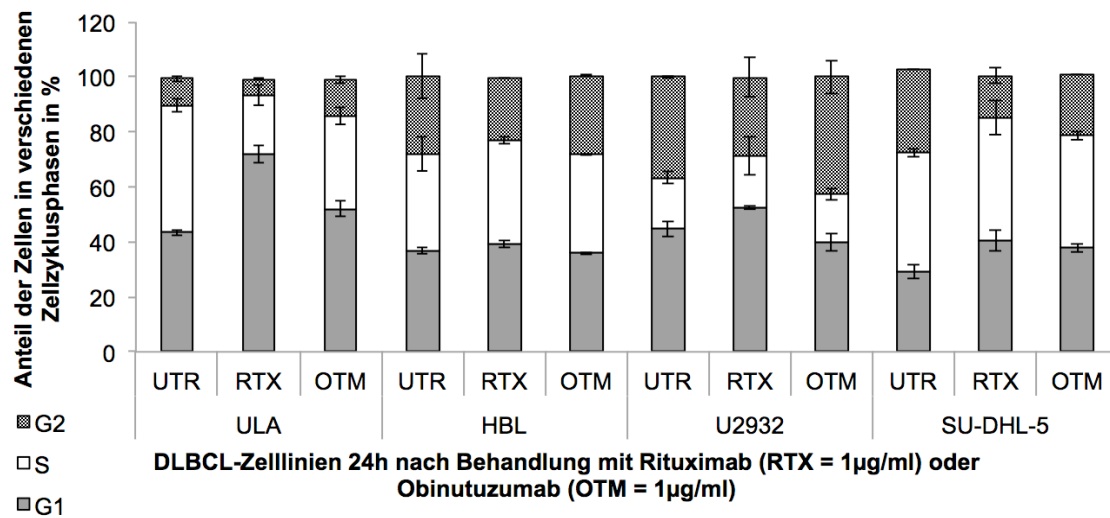
Abb. 15: Übersicht über antiproliferative Effekte der Anti-CD20-Antikörper.

Prozentualer Anteil bezogen auf unbehandelte Kontrollen 72 Stunden nach Behandlung mit Rituximab (RTX) oder Obinutuzumab (OTM). Signifikante Reduktionen der Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sind grün hinterlegt. Signifikante Unterschiede zwischen Rituximab und Obinutuzumab sind rot hinterlegt.

In den Zelllinien Ula, SU-DHL5, U2932 und SU-DHL4 induzierten beide Anti-CD20-Antikörper eine signifikante Zellreduktion (vgl. Abb.14/15 Seite 43). Die Zelllinie HBL-1 zeigte ein geringes Ansprechen gegenüber Rituximab und deutlich stärkere Sensibilität gegenüber Obinutuzumab. Obinutuzumab zeigte eine signifikant stärker ausgeprägte Proliferationshemmung als Rituximab in den 3 Zelllinien Ula, U2932 und HBL-1. In den anderen Zelllinien zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Rituximab und Obinutuzumab. Die Anti-CD20-Antikörper induzierten das stärkste Ansprechen in Zelllinie U2932. RTX reduzierte die viablen Zellen auf 59%, Obinutuzumab auf 43% der unbehandelten Kontrollen nach 72 Stunden Inkubation (vgl. Abb. 15, Seite 43).

5.1.3 Anti-CD20-Antikörper verursachen G1-Arrest

Eine Reduktion der Zellzahl kann durch Hemmung der Zellzyklusprogression, direkte Induktion von Zelltod, oder einer Kombination der beiden Mechanismen verursacht werden. Um zu evaluieren auf welchen der Mechanismen die Wirkung der Anti-CD20-Antikörper beruht wurde der Zellzyklus untersucht (vgl. Abb. 16, Seite 45). Hierfür wurde die Propidiumiodid-Färbung zur Analyse des DNA-Gehaltes der Zellen genutzt. Es zeigten sich große Sub-G1-Populationen, welche apoptotischen/nekrotischen Zellfragmenten entsprechen, diese wurden für die Zellzyklusanalyse nicht beachtet. Die Anti-CD20-sensiblen Zelllinien (Ula, U2932, SU-DHL5) und die Rituximab-resistente und Obinutuzumab-sensible Zelllinie HBL-1 wurden, wie zuvor beschrieben, mit den beiden Anti-CD20-Antikörpern behandelt und nach 24 Stunden Inkubation untersucht.



p-Werte	ULA	HBL-1	U2932	SU-DHL 5
UTR:RTX	0,002	0,186	0,147	0,017
UTR:OTM	0,080	0,964	0,231	0,013
RTX:OTM	0,031	0,326	0,097	0,365

Abb. 16: Zellzyklusanalysen mittels PI-Färbung

4 DLBCL-Zelllinien 24 Stunden nach Behandlung mit Anti-CD20-Antikörpern. Die Säulen repräsentieren den prozentuellen Anteil der Zellen in G1-, S- und G2-Phase. Die Tabelle zeigt p-Werte der einzelnen Therapien. Signifikante Werte sind grau hinterlegt.

Rituximab verursachte signifikanten G1-Arrest in Zelllinien Ula und SU-DHL5. Zelllinie U2932 zeigte eine ähnliche Tendenz ohne Signifikanzniveau zu erreichen. In Zelllinie Ula erhöhte Rituximab die Fraktion der Zellen in der G1-Phase von 43% auf 73%. In der Zelllinie SU-DHL5 erhöhte Rituximab die G1-Fraktion von 29 % auf 40%. Obinutuzumab erhöhte die G1-Fraktion signifikant in der Zelllinie SU-DHL5 von 29% auf 39%. In den Zelllinien Ula, HBL-1 und U2932 induzierte Obinutuzumab keine signifikanten Veränderungen des Zellzyklus. Rituximab war ausschließlich in Zelllinie Ula signifikant effektiver in der Induktion von Zellzyklusarrest. In Zelllinie HBL-1 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des Zellzyklus. Zusammenfassend zeigen sich sehr unterschiedliche Auswirkungen der Anti-CD20-Antikörper auf den Zellzyklus, so dass die Wirkmechanismen auf Ebene der Induktion von Zelltod als bedeutender zu erachten sind.

5.1.4 Anti-CD20-Antikörper induzieren Zelltod

In der Analyse des Zellzyklus zeigten sich deutliche Sub-G1-Populationen und gaben Hinweise auf zytotoxische Effekte der beiden Anti-CD20-Antikörper (vgl. Abb. 17). Die schnelle Verringerung der Zellzahl nach Anti-CD20-Behandlung innerhalb der ersten 24 Stunden im Vergleich zu den Anfangswerten legt direkt zytotoxische Mechanismen nahe. Eine Verringerung gegenüber der Zellzahl zu t_0 kann durch Proliferationshemmung nicht erklärt werden. Vier DLBCL-Zelllinien wurden wie zuvor beschrieben mit Rituximab oder Obinutuzumab behandelt. Um den Wirkmechanismus genauer zu untersuchen benutzten wir Annexin V-PE/7-AAD-Antikörper und Durchflusszytometrie zur differenzierten Analyse von präapoptotischen (Annexin V-PE positiv / 7-AAD negativ), apoptotischen (Annexin V-PE positiv / 7-AAD positiv) und nekrotischen Zellen (Annexin V-PE negativ / 7-AAD positiv).

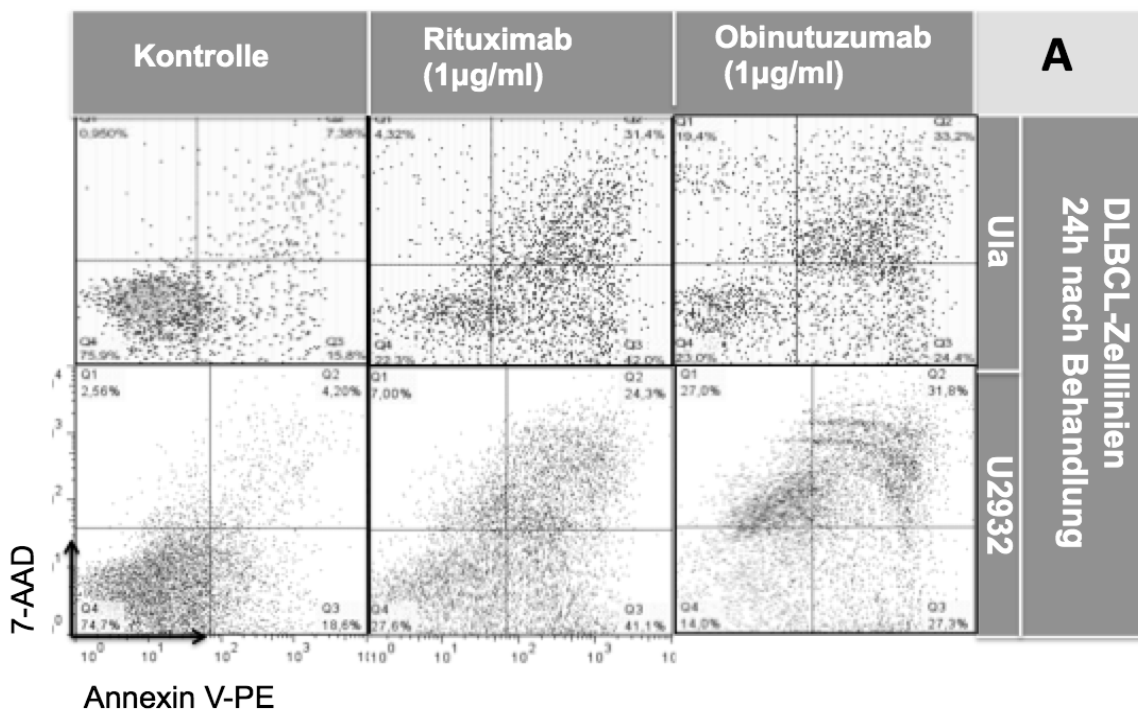


Abb. 17: Detektion zytotoxischer Effekte durch Annexin V-PE und 7-AAD-Färbung

Exemplarische Dot-Plots der Zelllinien Ula und U2932 nach 24 Stunden Inkubation mit Rituximab oder Obinutuzumab.

In den Abbildungen 19 und 20 (Seite 47/48) wurden präapoptotische, apoptotische und nekrotische Zellen zusammengefasst und die Abnahme viabler Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen angegeben.

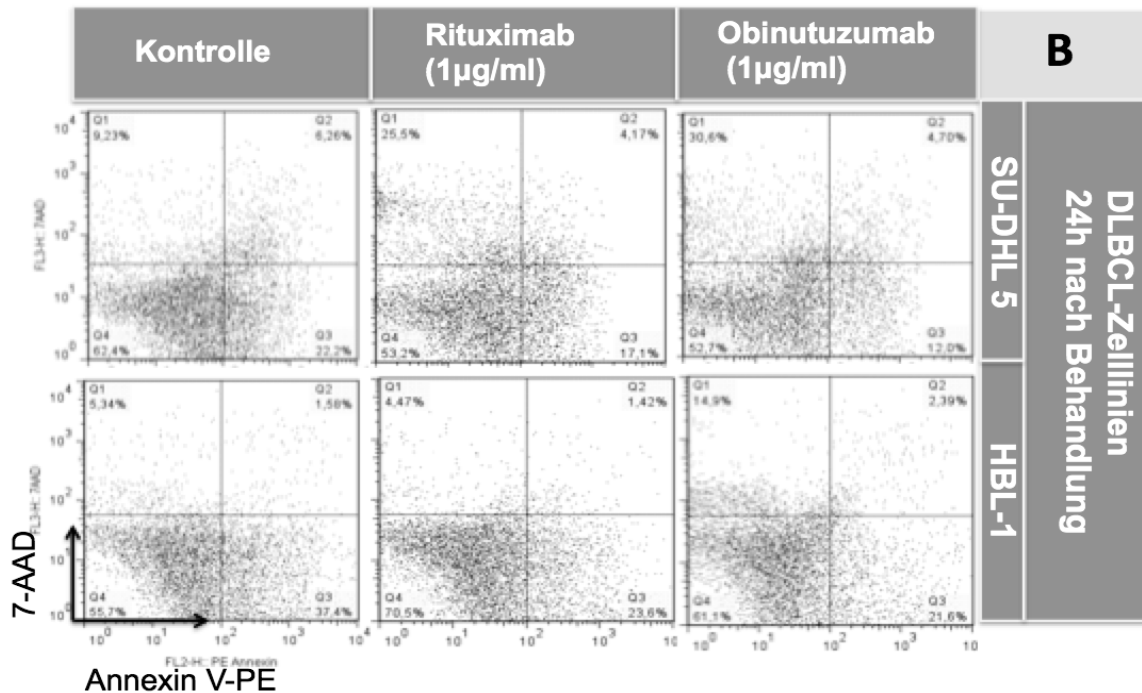


Abb. 18: Detektion zytotoxischer Effekte durch Annexin V-PE und 7-AAD-Färbung

Exemplarische Dot-Plots der Zelllinien SU-DHL5 und HBL-1 nach 24 Stunden Inkubation mit Rituximab oder Obinutuzumab.

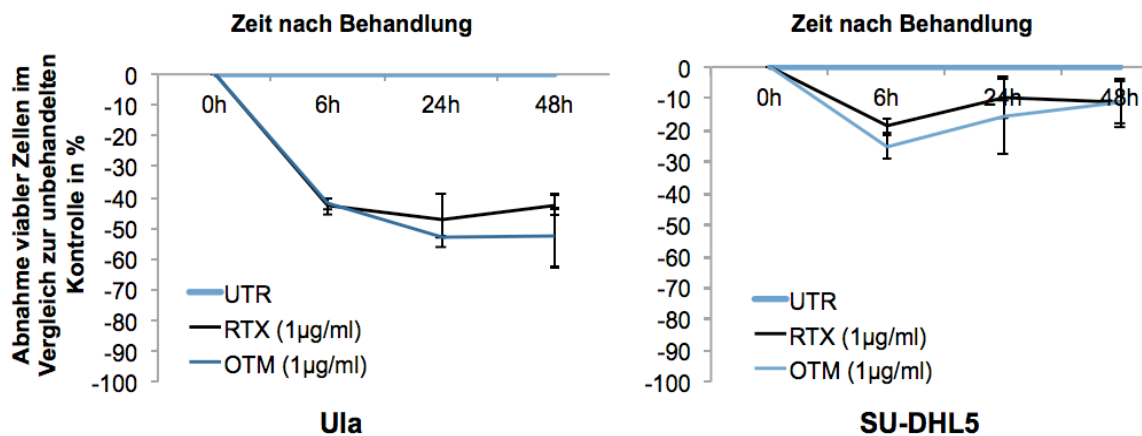


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf der Induktion von Zelltod

Abnahme viabler Zellen der Zelllinien Ula und SU-DHL5 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen durch Anti-CD20-Therapie nach 6, 24 und 48 Stunden.

Beide Anti-CD20-Antikörper verursachten eine direkte Induktion von Zelltod (vgl. Abb. 17,18, Seite 46/47). Die gegenüber Anti-CD20-Therapie sensiblen

Zelllinien Ula, U2932 und SU-DHL5 wurden 24 und 48 Stunden nach Behandlung analysiert. In den ersten 24 Stunden reduzierten beide Anti-CD20-Antikörper die viablen Zellen um 47% und 60% in den Zelllinien Ula und U2932. Die Antikörper reduzierten den Anteil viabler Zellen in den ersten 6 Stunden, ohne weitere Zunahme im zeitlichen Verlauf. In Zelllinie SU-DHL5 zeigte sich nur ein geringer Effekt. Nach 6 Stunden war Obinutuzumab effektiver als Rituximab (30% vs. 17%) (vgl. Abb. 19, Seite 47).

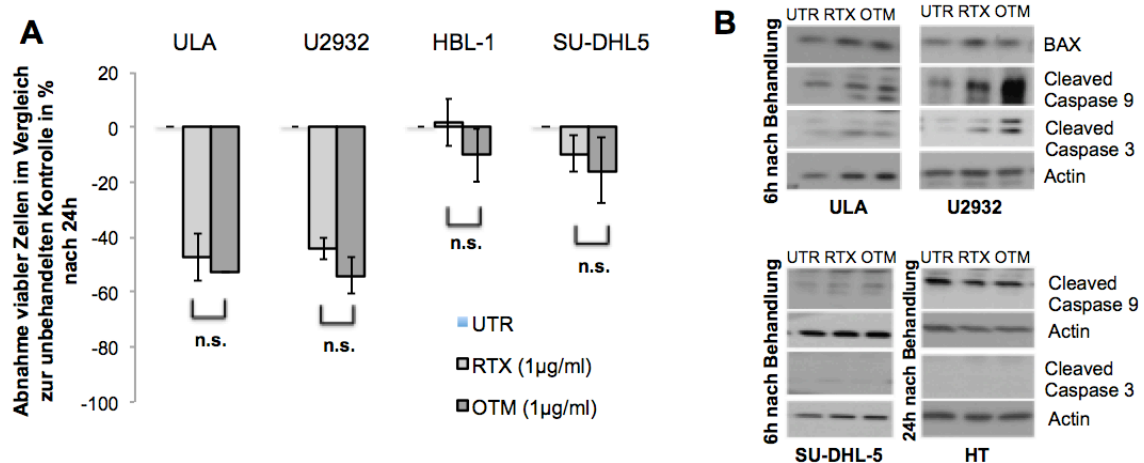


Abb. 20: Abnahme viabler Zellen und Caspaseaktivität

4 DLBCL-Zelllinien 24 Stunden nach Behandlung mit Anti-CD-20-Antikörpern (A) und korrespondierende Western Blot-Analysen von Komponenten der apoptotischen Signalkaskade (B).

In der Zelllinie HBL-1 zeigte sich keine signifikante Verringerung viabler Zellen nach Rituximab- oder Obinutuzumab-Behandlung. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der beiden Antikörper in der Zelltodinduktion nach 24 Stunden. In der differenzierten Betrachtung der toten Zellen wird deutlich, dass Rituximab deutliche DNA-Fragmentation (Annexin V-PE positiv) bei intakter Membranpermeabilität verursacht (7-AAD negativ). Obinutuzumab hingegen verursacht primär eine gestörte Membranpermeabilität (7-AAD positiv). Die Bestandteile der apoptotischen Signalkaskade Caspase 3 und 9 sowie das proapoptotische Protein Bax wurden mittels Western Blot untersucht. In den Zelllinien U2932 und Ula induzierten die beiden Anti-CD20-Antikörper signifikant die Spaltung beider Caspasen. Die insensitive Zelllinie HT und die schwach-sensible Zelllinie SU-DHL5 zeigten keine Erhöhung apoptotischer Signalbestandteile (vgl. Abb. 20, Seite 48).

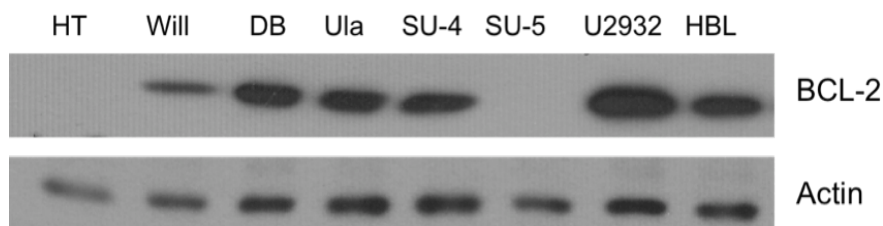


Abb. 21: Western Blot-Analysen

Basale Expression des Proteins BCL-2 in 8 unbehandelten DLBCL-Zelllinien.

Die Expression von BCL-2 wurde mittels Western Blot analysiert (vgl. Abb. 21). In 6 von 8 Zelllinien zeigte sich eine deutliche Expression von BCL-2. Nur die Zelllinien HT und SU-DHL5 zeigten keine Expression des Proteins. Interessanterweise induzierten Anti-CD20-Antikörper in den zwei BCL-2-negativen Zelllinien HT und SU-DHL5 keine Caspaseaktivität. Dies lässt über eine Rolle von BCL-2 in CD20-Antikörper-induzierter Zytotoxizität spekulieren.

5.1.5 Anti-CD20-Antikörper beeinflussen den PI3K-, ERK- und p38 MAPK-Signalweg

Im nächsten Schritt erfolgten semi-quantitative Proteinanalysen mittels Western Blot. Der Einfluss der Anti-CD20-Antikörper auf intrazelluläre Signalkaskaden wurde untersucht (vgl. Abb. 22/23, Seite 50/51). Die Effekte von Rituximab (1 µg/ml) oder Obinutuzumab (1 µg/ml) auf wichtige Komponenten des PI3K/AKT/mTOR-, des RAS/ERK/MEK- und des p38 MAPK-Signalweges wurden untersucht. Vier DLBCL-Zelllinien wurden wie zuvor beschrieben mit Rituximab oder Obinutuzumab für 6 oder 48 Stunden inkubiert (vgl. Abb. 22, Seite 50). Anschließend erfolgte die semiquantitative Analyse der phosphorylierten Formen von AKT als zentrales Protein des PI3K-Signalweges, p42/44 als Komponente des ERK1/2-Signalweges sowie p38 als Komponente des p38 MAPK-Signalweges. Es zeigten sich zeit- und zelllinienspezifische Veränderungen der oben genannten Proteine.

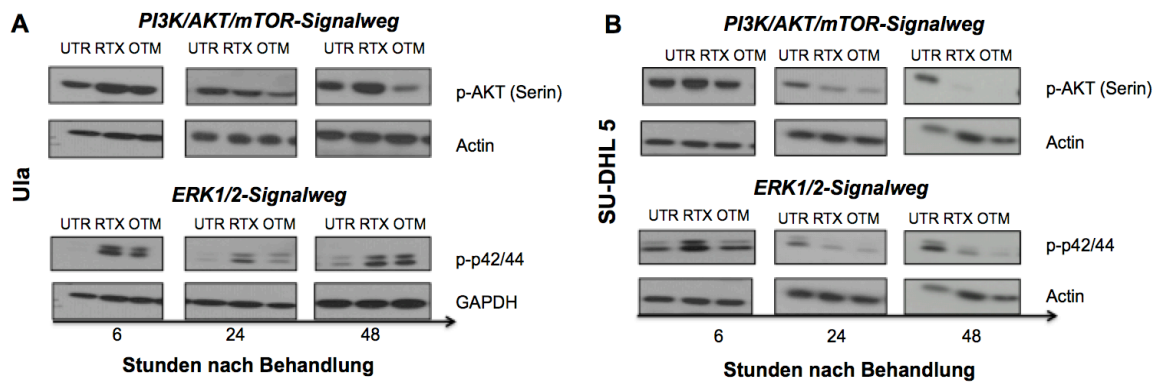


Abb. 22: Western Blot-Analysen

Komponenten der PI3K- bzw. ERK-Signalwege im zeitlichen Verlauf der Zelllinie Ula (A) und SU-DHL 5 (B) nach Inkubation mit Rituximab (RTX = 1 µg/ml) oder Obinutuzumab (OTM = 1 µg/ml) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (UTR). GAPDH dient als Ladekontrolle.

Die phosphorylierten Formen von AKT, ERK und p38 waren nach Rituximab-Inkubation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen in allen untersuchten Zelllinien nach 6 Stunden hochreguliert. Es zeigten sich keine Veränderungen der unphosphorylierten Proteine. In den Rituximab-sensiblen Zelllinien Ula und U2932 zeigte sich eine Erhöhung der gespaltenen Caspase 3. In den schlecht ansprechenden Zelllinien SU-DHL5 und HT kam es nicht zur Spaltung von Caspasen. Im Gegensatz zu Rituximab verursachte Obinutuzumab keine vergleichbare Hochregulierung von p-AKT. In den Zelllinien Ula und U2932 führte Obinutuzumab jedoch zur Induktion von phosphoryliertem p42/44 und p38 sowie zur Spaltung der Caspase 3. In den Zelllinien HT und SU-DHL5 zeigte Obinutuzumab keine Effekte auf p-p42/44, p-p38 oder Caspase 3. Anschließend wurde die zeitliche Kinetik der Medikamentenwirkung der Zelllinien SU-DHL5 und Ula über 6, 24 und 48 Stunden untersucht (vgl. Abb. 23, Seite 51). In Zelllinie Ula blieb die Aktivierung der PI3K- und ERK1/2-Signalwege nach Behandlung mit Rituximab über 24 und 48 Stunden erhalten. Obinutuzumab hingegen zeigte über 24 und 48 Stunden inhibierende Effekte auf p-AKT und keinen Einfluss auf den ERK1/2-Signalweg. In Zelllinie SU-DHL5 kam es nach den aktivierenden Effekten nach 6 Stunden zur Inhibition der PI3K- und ERK1/2-Signalwege über 24 und 48 Stunden. Zusammenfassend zeigt sich kein einheitliches Bild. Dies lässt über unterschiedliche Wirkmechanismen der beiden Antikörper und den Einfluss der genetischen

Abberationen der verschiedenen Zelllinien auf die konsekutiven Signalalterationen nach Anti-CD-20-Inkubation spekulieren.

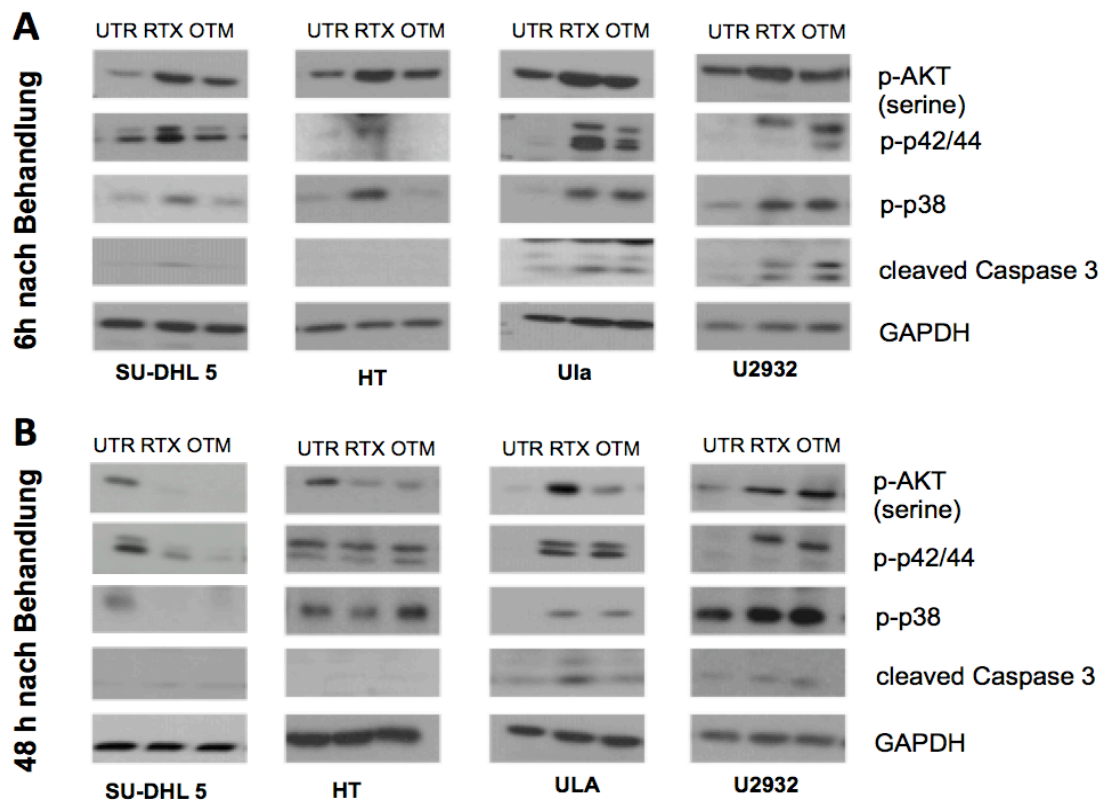


Abb. 23: Western Blot Analysen

Komponenten der PI3K-, ERK1/2- und p38 MAPK-Signalwege sowie Caspase 3 in 4 DLBCL-Zelllinien 6 (A) und 48 (B) Stunden nach Inkubation mit Rituximab (RTX = 1 $\mu\text{g/ml}$) oder Obinutuzumab (OTM = 1 $\mu\text{g/ml}$) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (UTR).

5.2 Wirkung von Inhibitoren des BCR-Signalwegs

5.2.1 PI3K-Inhibitoren induzieren Proliferationshemmung

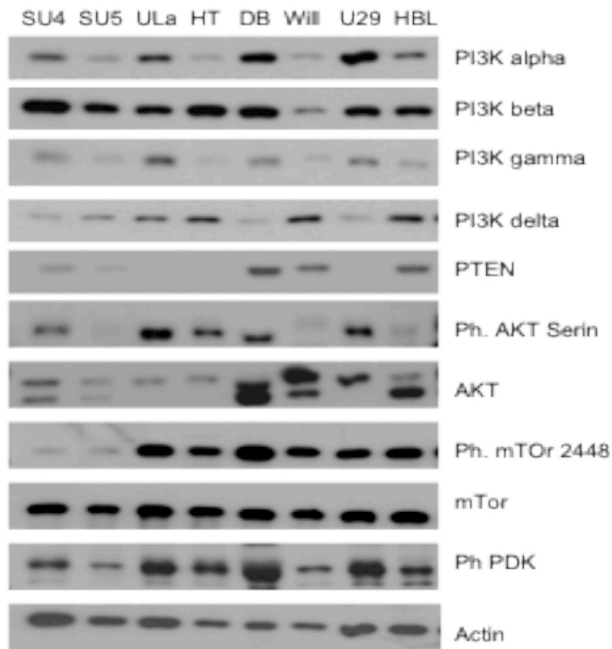


Abb. 24: Western Blot-Analyse

Basale Expression von Komponenten des PI3K-Signalwegs der untersuchten DLBCL-Zelllinien.

Die Effekte des selektiven PI3K δ -Inhibitors Idelalisib und des Pan-PI3K-Inhibitors LY294002 auf DLBCL-Zelllinien wurden untersucht. Zunächst erfolgte ein Screening auf die Expression der verschiedenen PI3K-Untereinheiten und Komponenten des PI3K-

Signalweges um Zelllinien mit tonisch-aktivem PI3K-Signalweg zu identifizieren. Hierzu erfolgte die semiquantitative Analyse einer Reihe von Proteinen der unbehandelten Zelllinien mittels Western Blot (vgl. Abb. 24, Seite 52).

Die verschiedenen Zelllinien zeigen eine sehr unterschiedliche Expression der verschiedenen Signalkomponenten. Alle Zelllinien exprimieren die PI3K δ -Untereinheit, auch wenn die Zelllinien U2932, SU-DHL4 und SU-DHL5 eine schwache Expression zeigen. Darüberhinaus zeigten die Zelllinien U2932, HT, Ula, sowie SU-DHL 5 den Verlust von PTEN.

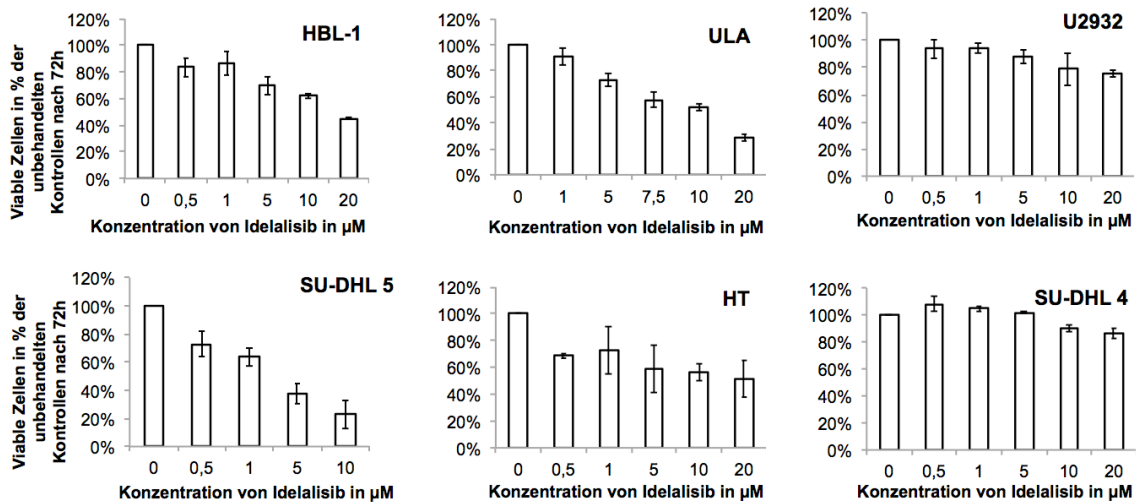


Abb. 25: Konzentrationsabhängige Proliferationshemmung

6 DLBCL-Zelllinien nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen von Idelalisib nach 72 Stunden in Prozent der unbehandelten Kontrolle. Senkrechte Indikatoren zeigen die Standardabweichung.

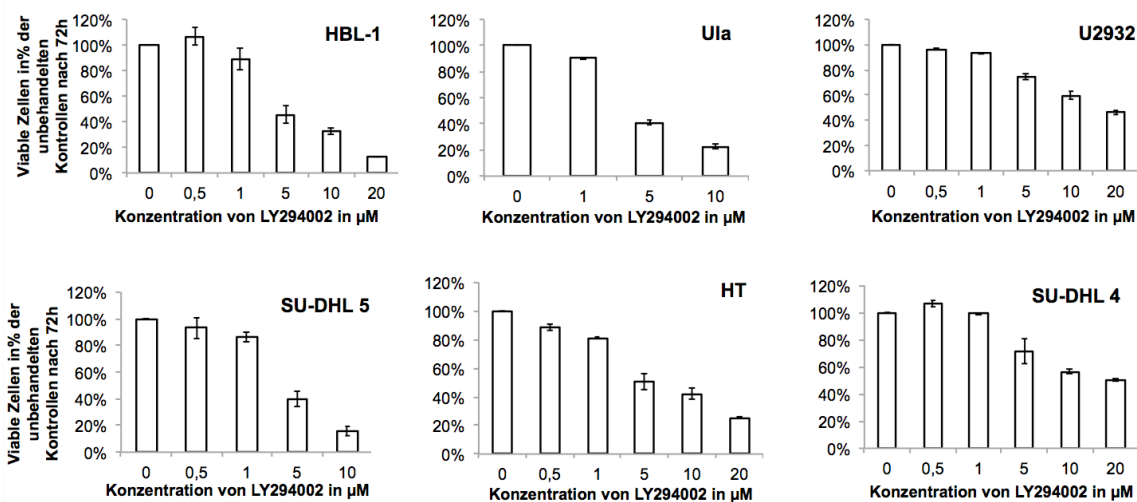


Abb. 26: Konzentrationsabhängige Proliferationshemmung

6 DLBCL-Zelllinien nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen von LY294002 nach 72 Stunden in Prozent der unbehandelten Kontrolle. Senkrechte Indikatoren zeigen die Standardabweichung.

Im nächsten Schritt wurde das Ansprechen der Zelllinien auf die beiden PI3K-Inhibitoren untersucht (vgl. Abb. 25, 26, Seite 53). Hierfür wurden 8 DLBCL-Zelllinien mit steigenden Konzentrationen (0,5 - 20 µM) Idelalisib oder LY294002 behandelt. Anschließend wurde die Zellzahl mittels des Trypanblau-

Ausschlusstests nach 72 Stunden ermittelt und in Bezug zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

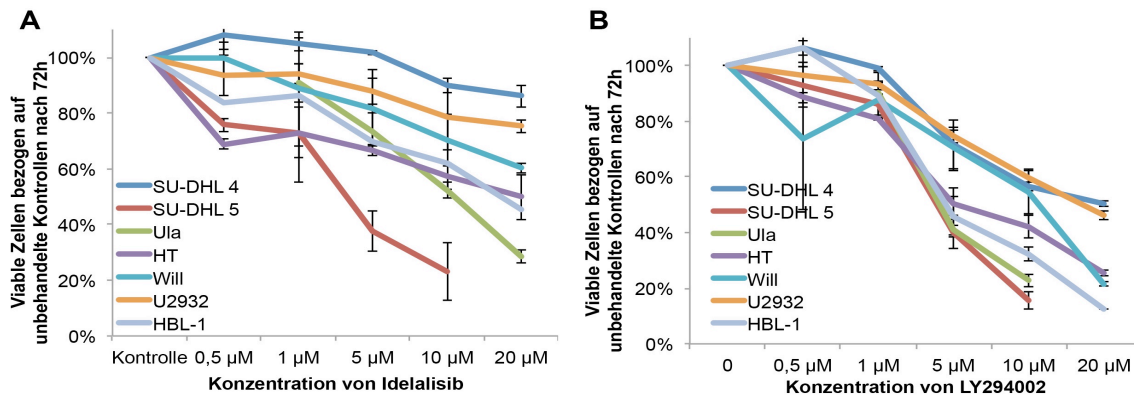


Abb. 27: Konzentrationsabhängige Proliferationshemmung

Hemmung der Zellproliferation von DLBCL-Zelllinien nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen von Idelalisib (A) oder LY294002 (B) in Prozent der Kontrollen. Senkrechte Indikatoren zeigen die Standardabweichung.

Es zeigte sich ein dosisabhängiges Ansprechen der verschiedenen Zelllinien (vgl. Abb. 27). Um unspezifische Effekte und einen möglichen Selektivitätsverlust von Idelalisib auszuschließen wurde für die weiteren Versuche eine Dosis von 5 µM verwendet.

Der zeitliche Verlauf der antiproliferativen Effekte wurde untersucht. Nach 24 Stunden zeigten sich kaum Effekte der Inhibitoren. Die Wirkung trat zunehmend über 48 und 72 Stunden auf (vgl. Abb. 28).

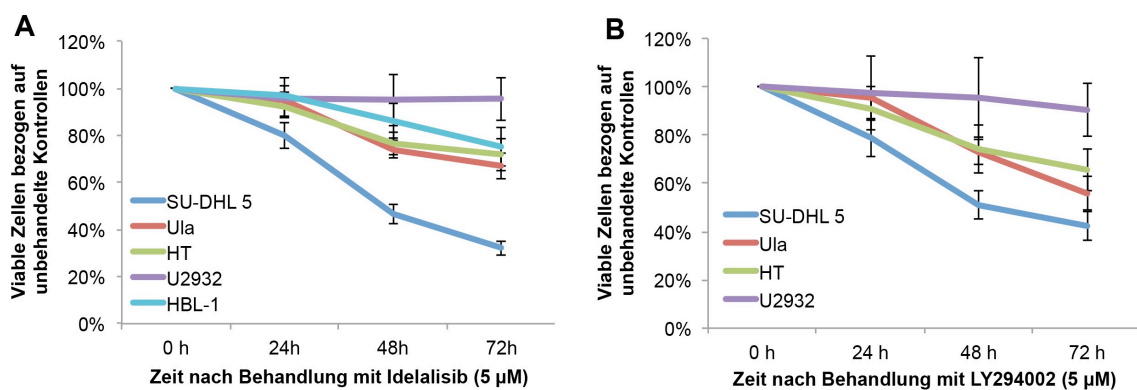


Abb. 28: Zeitabhängige Proliferationshemmung

DLBCL-Zelllinien im zeitlichen Verlauf über 72 Stunden nach Inkubation mit den PI3K-Inhibitoren Idelalisib (A) und LY294002 (B) in Prozent der Kontrollen. Senkrechte Indikatoren zeigen die Standardabweichung.

Die verschiedenen Zelllinien wurden mit Idelalisib oder LY294002 (5 μ M) hinsichtlich ihres Ansprechens nach 72 Stunden verglichen (vgl. Abb. 29). Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien. Während U2932 und SU-DHL4 kaum ein Ansprechen auf Idelalisib zeigten, konnte eine Gruppe mit intermediärer Sensibilität (Ula, HT, HBL-1) identifiziert werden. Die Zelllinie SU-DHL5 war am sensibelsten gegenüber PI3K-Inhibition. Der Pan-PI3K-Inhibitor war in zwei Zelllinien (SU-DHL 4, Ula) signifikant stärker wirksam als Idelalisib. In Zelllinie SU-DHL5 induzierte Idelalisib hingegen ein signifikant stärkeres Ansprechen. In Zelllinie HT und U2932 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Inhibitoren.

DLBCL-Zelllinien	72h	ID (5 μ M)	LY (5 μ M)	p-Wert (ID:LY)
	Ula	63 (+9)	56 (+8)	0,013
	SU-DHL 5	32 (+3)	42 (+3)	0,001
	U2932	95 (+9)	83 (+14)	0,483
	HT	72 (+7)	66 (+9)	0,773
	SU-DHL 4	99 (+5)	78 (+3)	<0,001

Abb. 29: Übersicht über antiproliferative Effekte

DLBCL-Zelllinien 72 Stunden nach Behandlung mit dem selektiven PI3K δ -Inhibitor Idelalisib (ID) und dem Pan-PI3K-Inhibitor LY294002 (LY). Signifikante Unterschiede zwischen den PI3K-Inhibitoren sind mit rot hinterlegt. Eine signifikante Zellreduktion ist mit grün hinterlegt.

5.2.2 PI3K-Inhibitoren induzieren G1-Arrest des Zellzyklus

Der Einfluss der beiden Inhibitoren auf den Zellzyklus wurde untersucht (vgl. Abb. 30, Seite 56). Beide Inhibitoren induzierten signifikanten G1-Arrest in Zelllinie Ula. LY294002 induzierte signifikant stärkeren G1-Arrest als Idelalisib. In den Zelllinien SU-DHL5 und U2932 kam es zu keinen signifikanten Veränderungen des Zellzyklus. Die ausgeprägte Zellzahlreduktion in Zelllinie U2932 in Abwesenheit von Zellzyklusarrest lassen auf eine untergeordnete Rolle des Zellzyklusarrest in Bezug auf den Mechanismus der Zellzahlreduktion schließen.

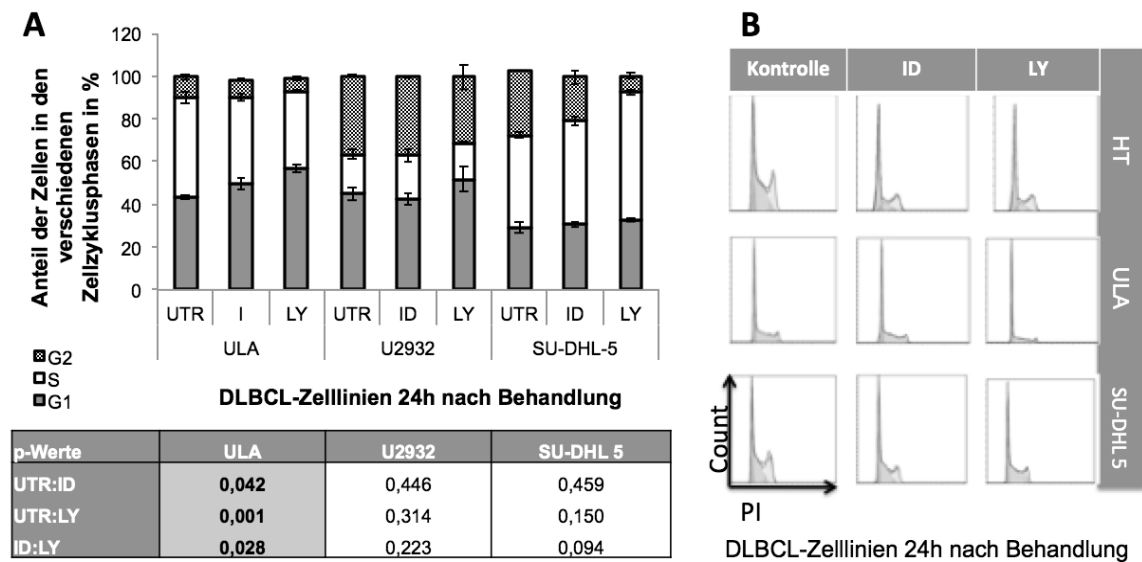


Abb. 30: Zellzyklusanalysen durch Propidiumiodid-Färbung

3 DLBCL-Zelllinien 24 Stunden nach Behandlung mit Idelalisib (ID = 5 μ M) oder LY294002 (LY = 5 μ M). Signifikante Ergebnisse sind mit grau hinterlegt (A). Korrespondierende Zellzyklusprofile (B).

5.2.3 PI3K-Inhibitoren induzieren Apoptose

Die zytotoxische Potenz der beiden Inhibitoren wurde mit Hilfe der Annexin V-PE/7-AAD-Färbung und Durchflusszytometrie untersucht. Die zwei Zelllinien Ula und HT wurden mit steigenden Konzentrationen (1 – 10 μ M) Idelalisib oder LY294002 behandelt und für 72 Stunden inkubiert (vgl. Abb. 31, 32; Seite 57).

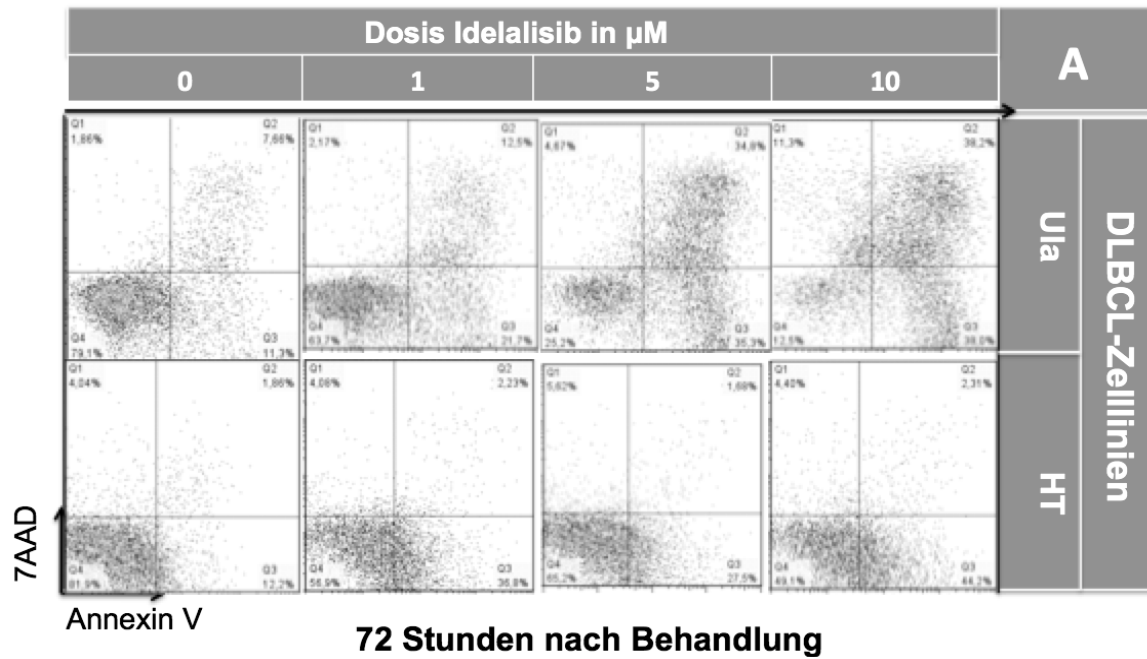


Abb. 31: Apoptoseassay mit Annexin V-PE und 7-AAD

Repräsentative Dot-Plots der DLBCL-Zelllinien Ula und HT nach 72 Stunden Inkubation mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors Idelalisib.

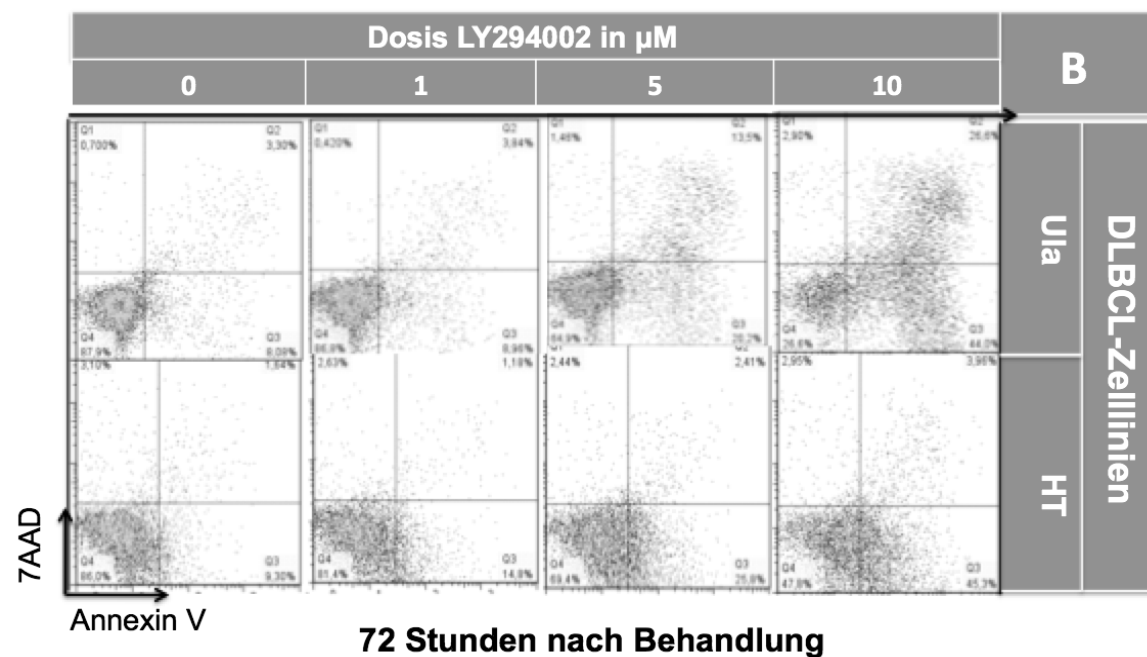


Abb. 32: Apoptoseassay mit Annexin V-PE und 7-AAD

Repräsentative Dot-Plots der DLBCL-Zelllinien Ula und HT nach 72 Stunden Inkubation mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors LY294002.

Die beiden Inhibitoren führten zu einem konzentrationsabhängigen Zuwachs von präapoptotischen und apoptotischen Zellen in Zelllinie Ula. In Zelllinie HT zeigte sich nur ein schwacher Zuwachs präapoptotischer Zellen bei einer hohen Dosis von 10 μ M.

Die zeitliche Kinetik der Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Idelalisib oder LY294002 (5 μ M) wurde an den 3 Zelllinien Ula, SU-DHL5 und HBL-1 untersucht (vgl. Abb. 34; Seite 59). In Zelllinie HBL-1 kam es nur zu schwacher Induktion von Apoptose nach 48 Stunden. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Idelalisib und LY294002. In Zelllinie Ula zeigte sich ein progredienter Zuwachs apoptotischer Zellen über 24 und 48 Stunden.

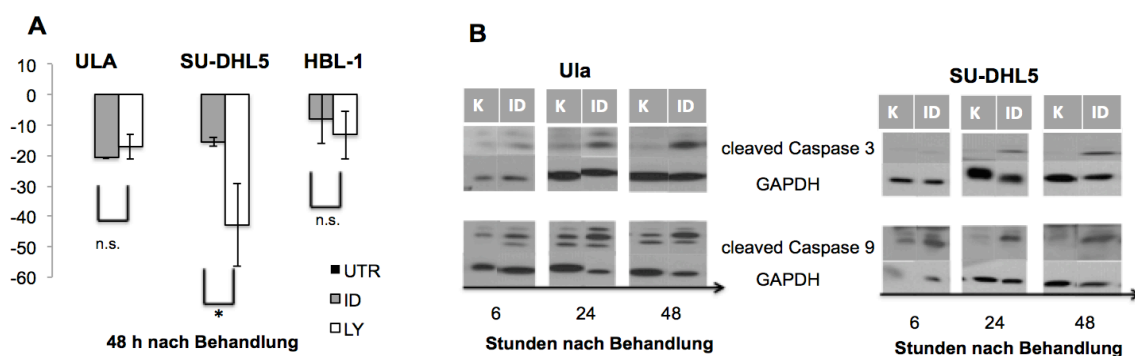


Abb. 33: Apoptose nach Behandlung mit PI3K-Inhibitoren

Abnahme viabler Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit Idelalisib oder LY294002 in 3 DLBCL-Zelllinien (A). Korrespondierende Western Blots der Caspasen 3 und 9 im zeitlichen Verlauf (B).

Nach 6 Stunden war kein Zuwachs apoptotischer Zellen nachweisbar. In Zelllinie SU-DHL5 zeigte sich der stärkste Zuwachs apoptotischer Zellen. Es zeigte sich eine zeitlich progrediente Induktion von Apoptose zwischen 6 und 48 Stunden. In Zelllinie SU-DHL5 war LY294002 signifikant stärker wirksam als Idelalisib. In Ula und HBL-1 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Inhibitoren (vgl. Abb. 33A, Seite 58).

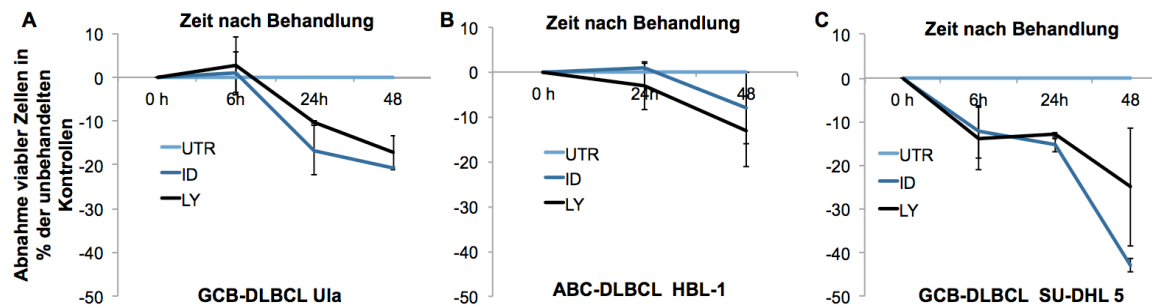


Abb. 34: Zeitlicher Verlauf der Apoptoseinduktion

Abnahme viabler Zellen in % der unbehandelten Kontrollen in den DLBCL-Zelllinien Ula (A), HBL-1 (B) und SU-DHL5 (C) nach Behandlung mit Idelalisib (blau) oder LY294002 (schwarz) im zeitlichen Verlauf über 6, 24 und 48 Stunden.

Proteinproben der Zelllinien SU-DHL5 und Ula wurden mittels Western Blot im zeitlichen Verlauf (6, 24, 48 Stunden) auf die Expression der gespaltenen Caspasen 3 und 9 nach Behandlung mit Idelalisib untersucht (vgl. Abb. 33B; Seite 58). Idelalisib induzierte die Spaltung der Caspasen 3 und 9 progredient über die Zeit. Die Caspasenaktivität korreliert somit mit den Ergebnissen der Proliferations- und Apoptoseanalysen.

5.2.4 PI3K-Inhibitoren führen zur Inhibition der PI3K- und ERK1/2-Signalwege

Der Einfluss der Inhibitoren auf intrazelluläre Signalkaskaden wurde untersucht. Die Zelllinien SU-DHL5, U2932 und Ula wurden mit Idelalisib oder LY294002 (5 μ M), wie zuvor beschrieben, behandelt und Proteinproben für Western Blot-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten (6, 24, 48 Stunden) entnommen.

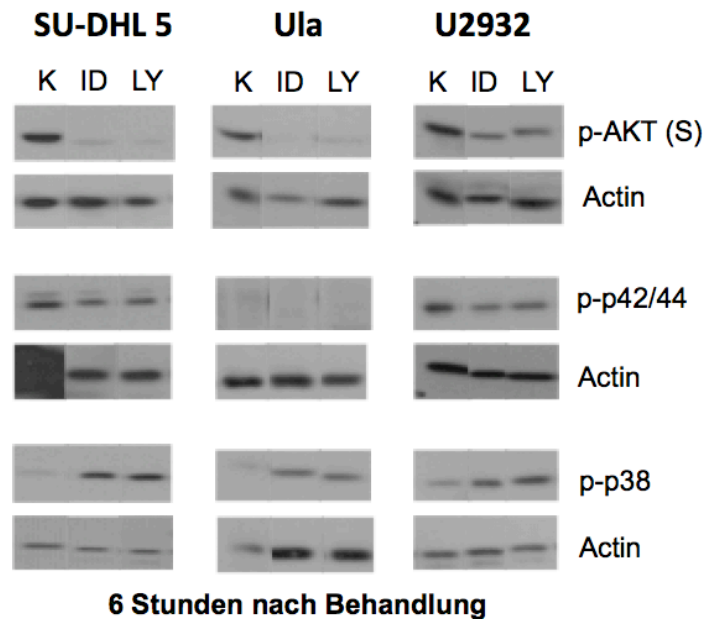


Abb. 35: Western Blot-Analysen nach Behandlung mit PI3K-Inhibitoren

Komponenten des PI3K-, ERK- und p38 MAPK-Signalweges der Zelllinien SU-DHL 5, Ula und U2932 nach 6 Stunden Inkubation mit PI3K-Inhibitoren.

Beide Inhibitoren inhibierte nach 6 Stunden die Phosphorylierung von AKT und p42/44 als zentrale Komponenten des PI3K/AKT/mTOR- sowie des ERK-Signalweges. Zudem induzierte Idelalisib die Phosphorylierung der p38 MAPK (vgl. Abb. 35, Seite 60). Weitere Komponenten dieser Signalwege wurden nach 24 Stunden untersucht und bestätigten diese Ergebnisse. Western Blot-Analysen von p-AKT wurden nach 6, 24 und 48 Stunden durchgeführt um die Kinetik der Inhibitoren darzustellen (vgl. Anhang 4, Seite Seite 94).



48 Stunden nach Behandlung

Abb. 36: Western Blot-Analysen nach Behandlung mit PI3K-Inhibitoren

Expression von p-AKT und p-p42/44 in Zelllinie SU-DHL5 nach 48 Stunden Inkubation mit Idelalisib oder LY294002.

Idelalisib inhibierte den PI3K- und ERK1/2-Signalweg deutlich zwischen 6 und 24 Stunden. Im weiteren Verlauf über 48 Stunden kam es zum Wiederanstieg der p-AKT Expression nach Behandlung mit Idelalisib, nicht jedoch nach Therapie mit LY294002. Dies lässt über mögliche Reaktivierung des PI3K-Signalwegs über andere Untereinheiten nach selektiver Inhibition spekulieren.

5.3 Kombination von Anti-CD20-Antikörpern mit Inhibitoren des PI3K-Signalweges

5.3.1 Proliferationshemmung

Die beiden Anti-CD20-Antikörper Rituximab und Obinutuzumab (1 µg/ml) wurden mit den beiden PI3K-Inhibitoren Idelalisib und LY294002 (5 µM) kombiniert und die kombinatorischen Effekte auf die Zellproliferation untersucht. Die Zelllinien wurden mit den einzelnen Monotherapien und Kombinationen von Rituximab + Idelalisib, Rituximab + LY294002, Obinutuzumab + Idelalisib sowie Obinutuzumab + LY294002 behandelt und die Zellzahlen mittels Trypanblau-Ausschlussverfahren analysiert. Die Kombinationstherapien wurden mit den Monotherapien und unbehandelten Kontrollen verglichen. Die Interaktion wurde mittels „fraction of product“ in antagonistisch, additiv oder synergistisch eingeteilt. Zudem wurde die Signifikanz der Abweichung zwischen Monotherapien und Kombinationstherapien mittels p-Wert bestimmt.

Die Kombination von Rituximab und Obinutuzumab mit Idelalisib wurde an 7 DLBCL-Zelllinien (Ula, SU-DHL4, SU-DHL5, HT, U2932, HBL-1, Will-1) untersucht (vgl. Abb. 37-39, Seite 62-63; Anhang 5, Seite 95). Die Kombination der beiden Anti-CD20-Antikörper mit Idelalisib verursachte in 5 Zelllinien ausschließlich additive Effekte. Alle ABC-DLBCL reagierten additiv auf Kombinationstherapie, lediglich die beiden t(14;18)-translozierten GCB-Zelllinien ULA und SU-DHL4 zeigten antagonistische Effekte. Die Kombination aus Obinutuzumab und PI3K-Inhibitoren verursachte in diesen Zelllinien nach 48 Stunden additive Effekte. Die Interaktion von Rituximab und Idelalisib blieb antagonistisch.

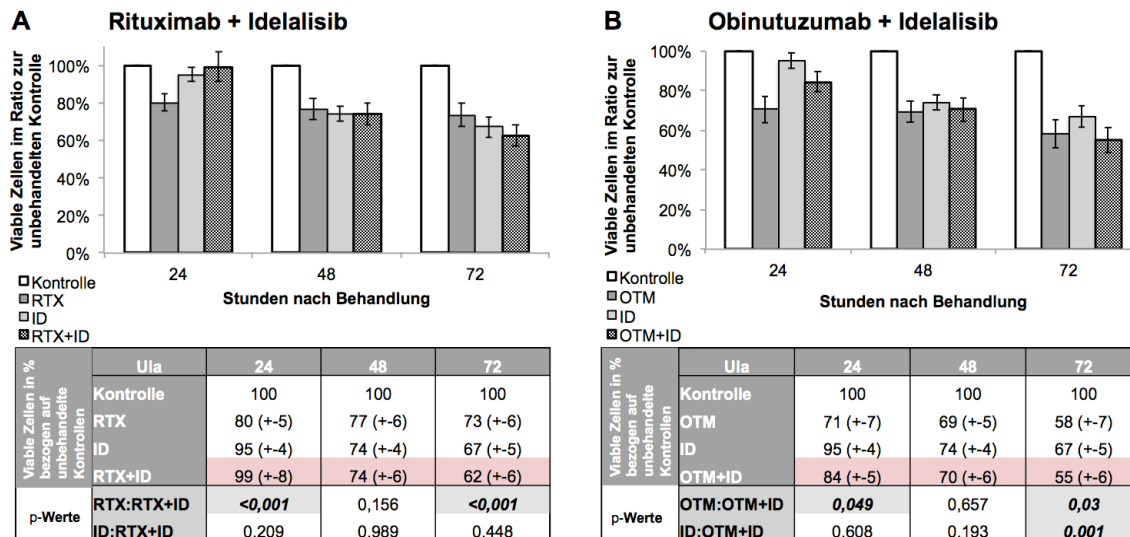


Abb. 37: Antiproliferative Effekte der Kombinationstherapie

Zelllinie Ula nach Inkubation mit Rituximab + Idelalisib (A) und Obinutuzumab + Idelalisib (B) im zeitlichen Verlauf. Die Interaktion nach „Fraction of Product“ ist farbig kodiert. Rot entspricht einer antagonistischen Interaktion. Signifikante Abweichungen sind grau hinterlegt.

In Zelllinie Ula sind die antagonistischen Effekte nach 48 und 72 Stunden weniger deutlich, bleiben nach „fraction of product“ allerdings erhalten. Die Kombination von Obinutuzumab und Idelalisib führte in Zelllinie SU-DHL5 zu synergistischen Effekten nach 24 Stunden. Nach 48 und 72 Stunden zeigte sich eine additive Inhibition des Zellwachstums. In allen anderen Zelllinien reduzierte die Kombination aus Anti-CD20-Antikörpern und PI3K-Inhibitoren das Zellwachstum additiv. Die Kombination von Rituximab und PI3K-Inhibitoren reduzierte die Proliferation ausschließlich in Zelllinie SU-DHL5 signifikant stärker als die effektivste Monotherapie nach 72 Stunden. In allen anderen Zelllinien kam es zu keinen signifikanten Abweichungen zwischen der am stärksten wirksamen Monotherapie und der Kombinationstherapie aus Rituximab und Idelalisib. Die Kombination Obinutuzumab und Idelalisib war signifikant effektiver als die am stärksten wirksame Monotherapie in den Zelllinien Ula, SU-DHL5 und U2932.

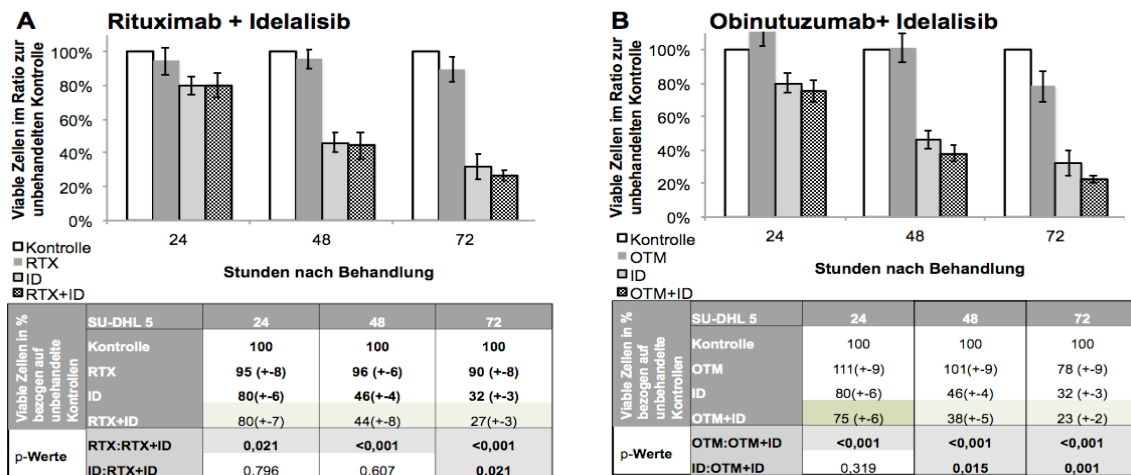


Abb. 38: Antiproliferative Effekte der Kombinationstherapien

Zelllinie SU-DHL5 nach Inkubation mit Rituximab + Idelalisib (A) und Obinutuzumab + Idelalisib (B) im zeitlichen Verlauf. Die Interaktion nach „Fraction of Product“ ist farblich kodiert. Dunkelgrün entspricht synergistischen, hellgrün additiven Effekten. Signifikante Abweichungen sind grau hinterlegt.

Diese Ergebnisse wurden mit 5 Zelllinien (Ula, SU-DHL4, SU-DHL5, HT, U2932) in Kombination mit LY294002 reproduziert. Die Kombination von Rituximab und LY294002 wirkte im Gegensatz zu Rituximab + Idelalisib in der Zelllinie SU-DHL 5 antagonistisch. Sonst entsprachen die Ergebnisse der Kombination von Idelalisib mit Anti-CD20-Antikörpern (vgl. Anhang 6, Seite 96).

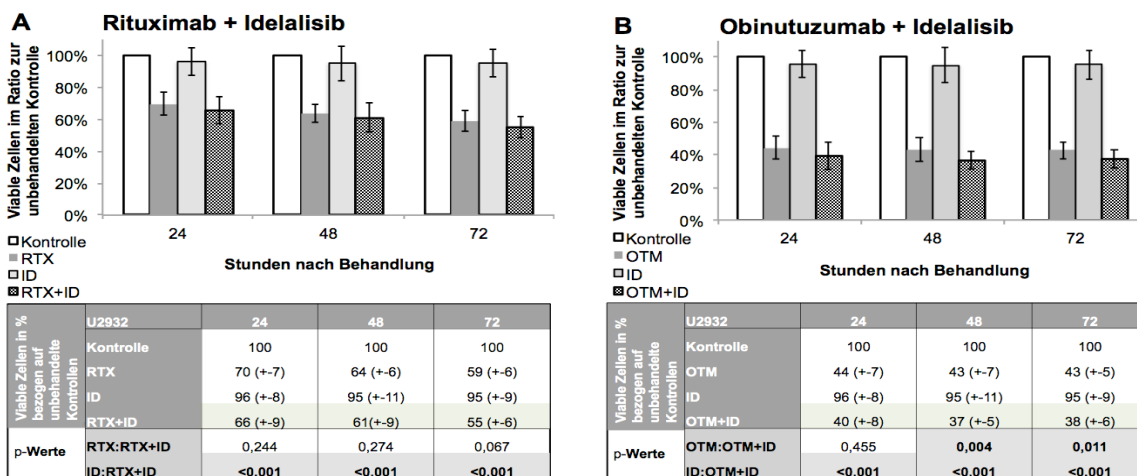


Abb. 39: Antiproliferative Effekte der Kombinationstherapien

Zelllinie U2932 nach Inkubation mit Rituximab + Idelalisib (A) und Obinutuzumab + Idelalisib (B) im zeitlichen Verlauf. Die Interaktion nach „Fraction of Product“ ist farblich kodiert. Hellgrün entspricht einer additiven Interaktion. Signifikante Abweichungen sind grau hinterlegt.

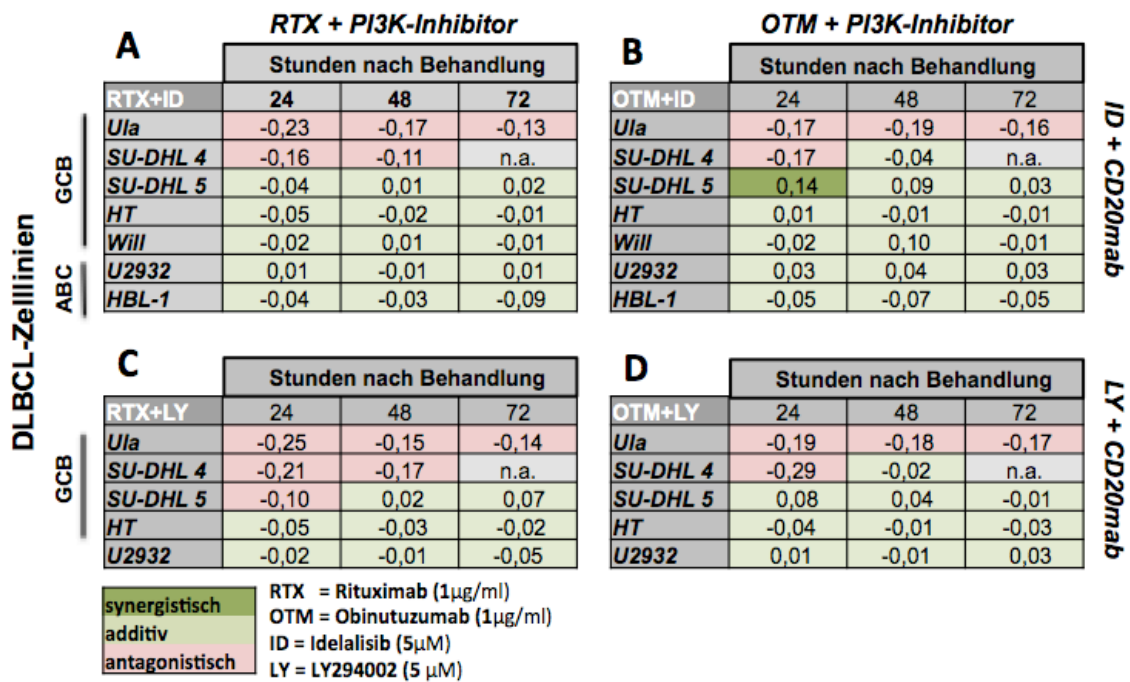


Abb. 40: „fraction of product“ im zeitlichen Verlauf

Übersicht über Kombinationseffekte nach Inkubation mit Rituximab + Idelalisib (A), Obinutuzumab + Idelalisib (B), Rituximab + LY294002 (C) und Obinutuzumab + LY294002 (D) der verschiedenen DLBCL-Zelllinien im zeitlichen Verlauf. Die Interaktion wurde mittels Fraction of Product in additiv (hellgrün), synergistisch (dunkelgrün) und antagonistisch (rot) eingeteilt.

5.3.2 Alterationen im Zellzyklus

Der Einfluss der Kombinationstherapien auf den Zellzyklus wurde in den Zelllinien Ula, U2932 und SU-DHL5 mittels PI-Färbung und Durchflusszytometrie untersucht (vgl. Abb. 41, Seite 65).

In Zelllinie Ula induzierte sowohl Rituximab, als auch Idelalisib signifikanten G1-Arrest. Rituximab war deutlich effektiver als Idelalisib. In der Kombinationstherapie kam es zu keiner signifikanten Abweichung zur Rituximab-Monotherapie. In Zelllinie SU-DHL5 erzeugte nur Rituximab signifikanten G1-Arrest, Idelalisib führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Zellen in der G1-Phase. Die Kombination von Rituximab und Idelalisib verursachte keine signifikante Abweichung zur Rituximab Monotherapie. In der Zelllinie U2932 zeigen sich ähnliche Tendenzen. Die Kombination von Obinutuzumab und Idelalisib induzierte in Zelllinie Ula den stärksten G1-Arrest,

allerdings kam es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen Obinutuzumab-Monotherapie und Kombinationstherapie. In den Zelllinien U2932 und SU-DHL5 war die Abweichung zwischen Obinutuzumab-Monotherapie und Kombinationstherapie nicht signifikant. Die Kombinationen der Anti-CD20-Antikörper mit LY294002 zeigten das gleiche Interaktionsmuster (vgl. Anhang 7, Seite 97).

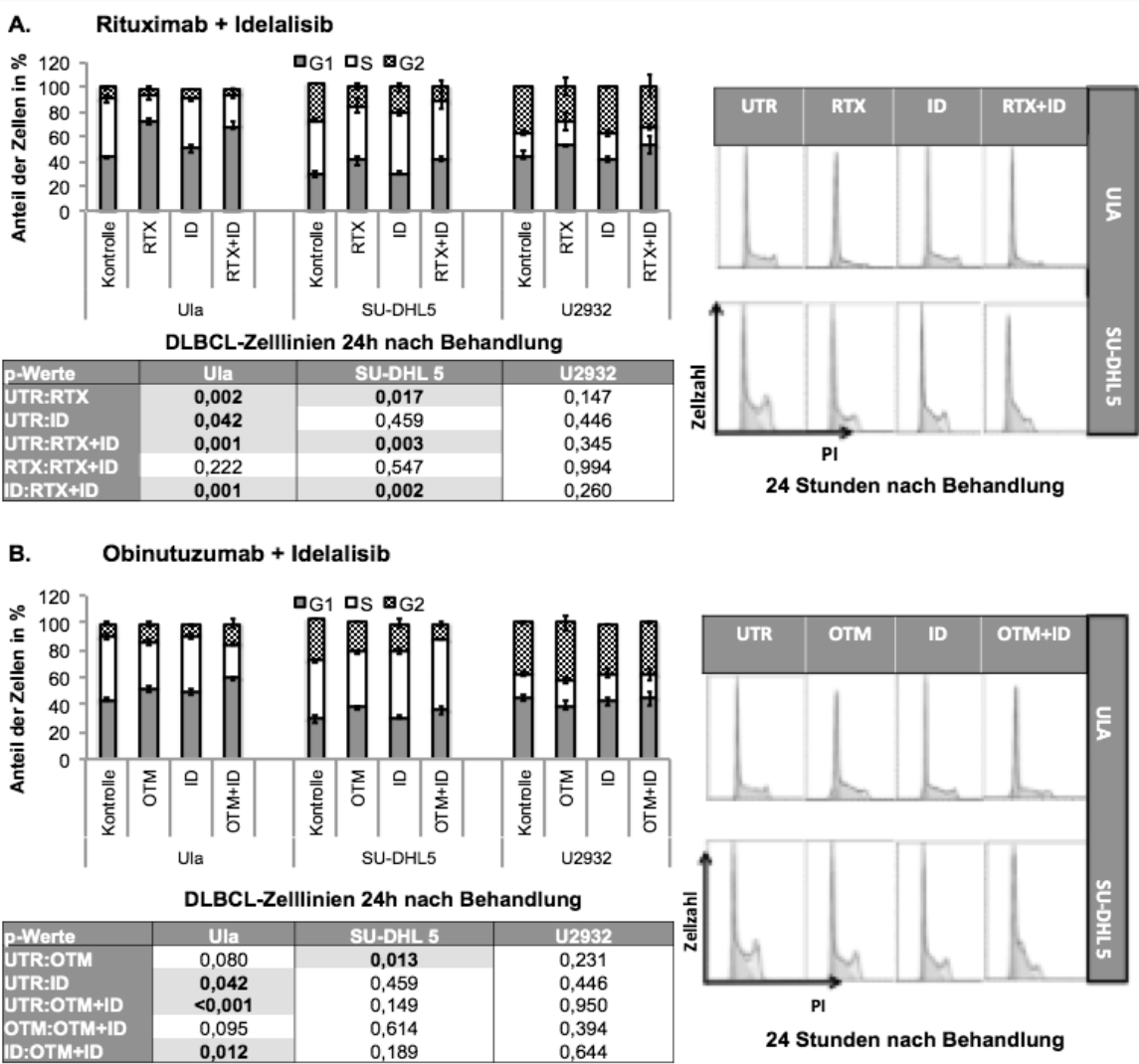


Abb. 41: Zellzyklusanalyse durch Propidiumiodid-Färbung
Kombination von Rituximab + Idelalisib (A) und Obinutuzumab + Idelalisib (B) in 3 DLBCL-Zelllinien nach 24 Stunden. Rechts sind die entsprechenden Zellzyklusprofile dargestellt. Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.

5.3.3 Induktion zytotoxischer Effekte

Die Zelllinien Ula, SU-DHL5 und U2932 wurden wie zuvor beschrieben mit Mono- und Kombinationstherapien der einzelnen Wirkstoffe behandelt und mittels Annexin V-PE/7-AAD-Färbung und Durchflusszytometrie auf die Induktion von zytotoxischen Effekten untersucht (vgl. Abb. 42-44, Seite 66-68; Anhang 8, Seite 98).

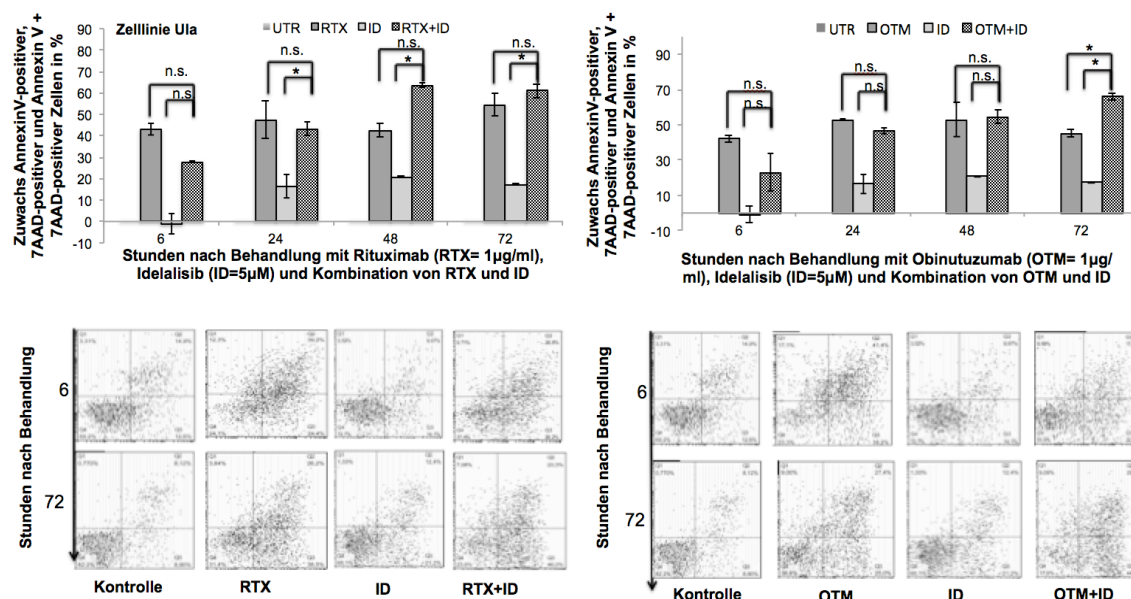


Abb. 42: Detektion zytotoxischer Effekte mit Annexin V-PE und 7-AAD

DLBCL-Zelllinie Ula nach Inkubation mit Rituximab + Idelalisib (links) und Obinutuzumab + Idelalisib (rechts) im zeitlichen Verlauf. Unten sind entsprechende Dot-Plots. „*“ markiert signifikante Ergebnisse; „n.s.“ - nicht signifikante Abweichungen.

In Zelllinie Ula induzierte die Kombination Rituximab + PI3K-Inhibitoren nach 6 Stunden eine signifikant stärkere Verringerung apoptotischer Zellen im Vergleich zu Rituximab alleine. Im zeitlichen Verlauf induzierten die Kombinationstherapien additive zytotoxische Effekte nach 48 und 72 Stunden. Insbesondere Obinutuzumab in Kombination mit den PI3K-Inhibitoren induzierten dabei additiv Zelltod. Die Kombination von Obinutuzumab und Idelalisib verursacht nach 72 Stunden eine signifikante Abweichung zur Obinutuzumab-Monotherapie. Ebenso die Kombination von Rituximab mit LY294002 nach 48 Stunden. In der Zelllinie SU-DHL5 induzierten die Anti-CD20-Antikörper nur geringfügig Apoptose. Die beiden PI3K-Inhibitoren verursachten deutlich stärker ausgeprägten Zelltod als die Antikörper. In den

ersten 24 Stunden kam es zu keiner signifikanten Wirkungssteigerung im Vergleich zur PI3K-Monotherapie. Nach 48 und 72 Stunden zeigten sich nach Kombinationstherapie leichte additive Effekte, ohne signifikante Abweichungen zur PI3K-Monotherapie zu verursachen. In Zelllinie U2932 induzierten beide Anti-CD20-Antikörper stark ausgeprägte zytotoxische Effekte. Die beiden PI3K-Inhibitoren zeigten nur eine schwache apoptotische Potenz. In den Kombinationen setzten sich die Effekte der Anti-CD20-Antikörper durch. Es kam zu keiner signifikanten Wirkungssteigerung im Vergleich zur Anti-CD20-Monotherapie.

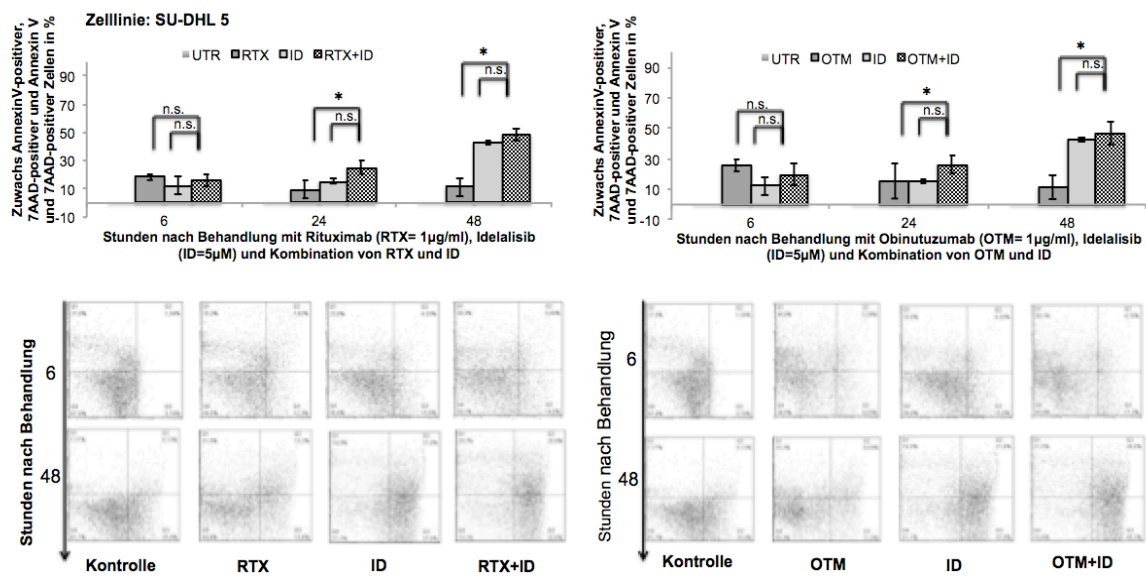


Abb. 43: Detektion zytotoxischer Effekte mit Annexin V-PE und 7-AAD
DLBCL-Zelllinie SU-DHL5 nach Inkubation mit Rituximab + Idelalisib (links) und Obinutuzumab + Idelalisib (rechts) im zeitlichen Verlauf. Unten sind entsprechende Dot-Plots. „*“ markiert signifikante Ergebnisse; „n.s.“- nicht signifikante Abweichungen.

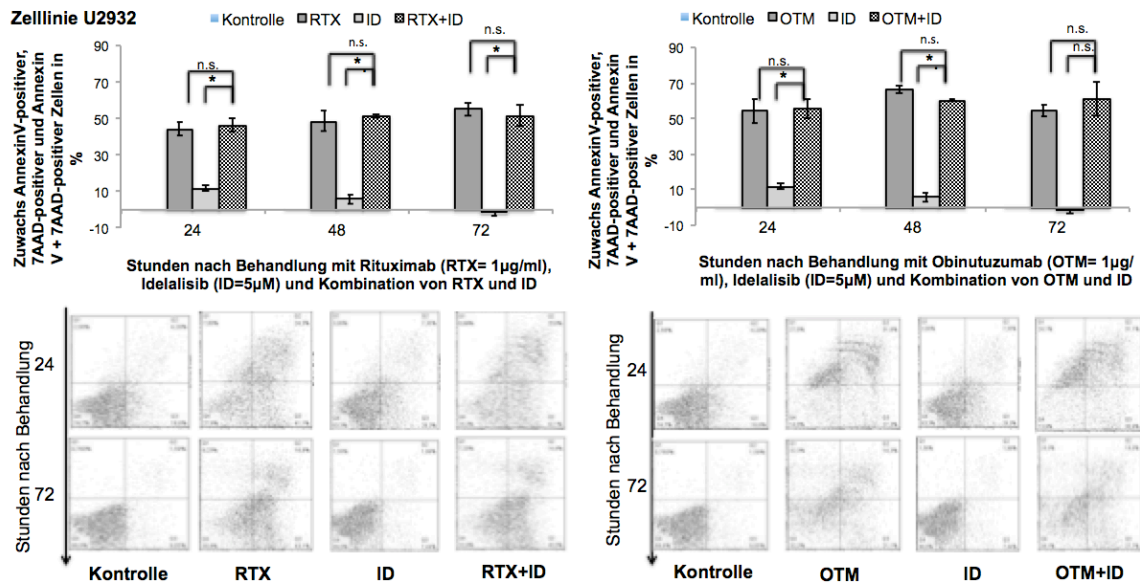


Abb. 44: Detektion zytotoxischer Effekte mit Annexin V-PE und 7-AAD
DLBCL-Zelllinie Ula nach Inkubation mit Rituximab + Idelalisib (links) und Obinutuzumab + Idelalisib (rechts) im zeitlichen Verlauf. Unten sind entsprechende Dot-Plots. „*“ markiert signifikante Ergebnisse; „n.s.“- nicht signifikante Abweichungen.

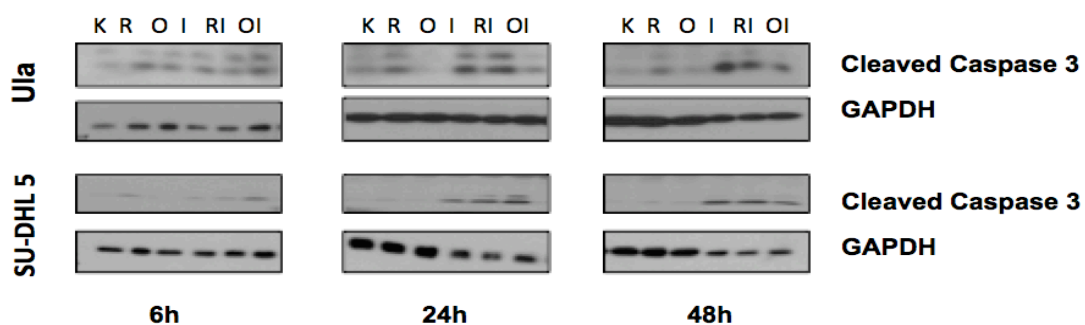


Abb. 45: Western Blot-Analysen
Zelllinien Ula und SU-DHL5 nach Mono- und Kombinationstherapie. Gespaltene Caspase-3 im zeitlichen Verlauf über 6, 24 und 48 Stunden.

Die Expression der gespaltenen Caspase 3 wurde in den Zelllinien Ula und SU-DHL 5 im zeitlichen Verlauf (6, 24, 48 Stunden) untersucht (vgl. Abb. 45, Seite 68). In Zelllinie Ula kam es nach 6 Stunden zur leicht additiven Spaltung der Caspase 3. Die Expression der Caspase 3 entsprach nach Behandlung mit Rituximab + Idelalisib der Idelalisib-Monotherapie. Nach Behandlung mit der Kombination Obinutuzumab + Idelalisib zeigte sich nach 24 und 48 Stunden eine schwächere Expression der gespaltenen Caspase 3 als nach Idelalisib

allein. In Zelllinie SU-DHL 5 zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen der PI3K-Inhibitor-Monotherapie und den Kombinationen mit Anti-CD20-Antikörpern. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Viabilitätsassays und gibt Hinweise auf Caspase-abhängige Wirkmechanismen.

5.3.4 Alteration der PI3K- und ERK1/2-Signalwege

Der Einfluss der Kombinationstherapien auf intrazelluläre Signalkaskaden wurde untersucht. Aufgrund der Vorergebnisse wurde insbesondere p-AKT, als zentrales Protein des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges sowie p-p42/44 (ERK1/2) als Vertreter des ERK1/2-Signalweges untersucht. Die Proteinanalysen wurden nach 1, 6, 24 und 48 Stunden durchgeführt um die Kinetik des Mechanismus darzustellen. Auf molekularer Ebene zeigten sich Unterschiede zwischen Rituximab und Obinutuzumab in Kombination mit Idelalisib sowie zeitliche Veränderungen in der Interaktion. In Zelllinie Ula inhibierten nach 1 und 6 Stunden die PI3K-Inhibitoren alleine und in Kombination mit Obinutuzumab signifikant die Phosphorylierung und Aktivierung von AKT. In Kombination mit Rituximab wirkte der Anti-CD20-Antikörper der Inhibition entgegen und p-AKT blieb im Vergleich zur PI3K-Monotherapie erhöht.

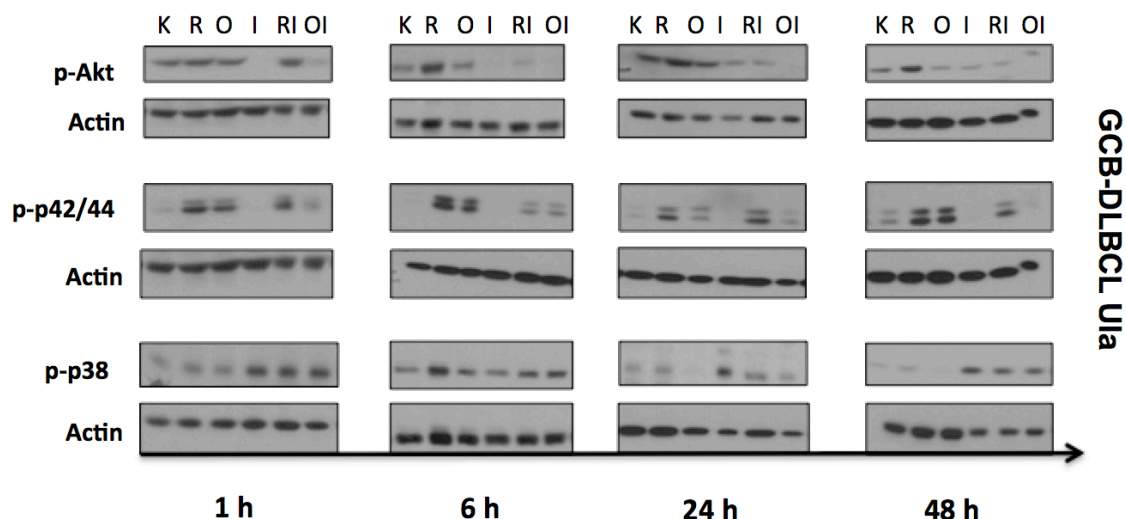


Abb. 46: Western Blot-Analysen

Komponenten der PI3K-, ERK- und p38 MAPK-Signalwege der DLBCL-Zelllinie Ula nach Inkubation mit Rituximab- (R), Obinutuzumab- (O) und Idelalisib-Monotherapie (I) sowie der Kombination aus Rituximab + Idelalisib (RI) und Obinutuzumab + Idelalisib (OI) im zeitlichen Verlauf.

Nach 24 und 48 Stunden blieb p-AKT signifikant inhibiert durch die Kombination von Obinutuzumab und Idelalisib, während sich ein Wiederanstieg nach PI3K-Inhibitor-Monotherapie zeigte. In Kombination mit Rituximab legte sich der initiale Antagonismus und es zeigte sich eine additive Inhibition von p-AKT. In Zelllinie Ula wird p-p42/44 von beiden Anti-CD20-Antikörpern zu allen untersuchten Zeitpunkten stark hochreguliert, die PI3K-Inhibitoren wirkten diesem Effekt entgegen (vgl. Abb. 46, Seite 69).

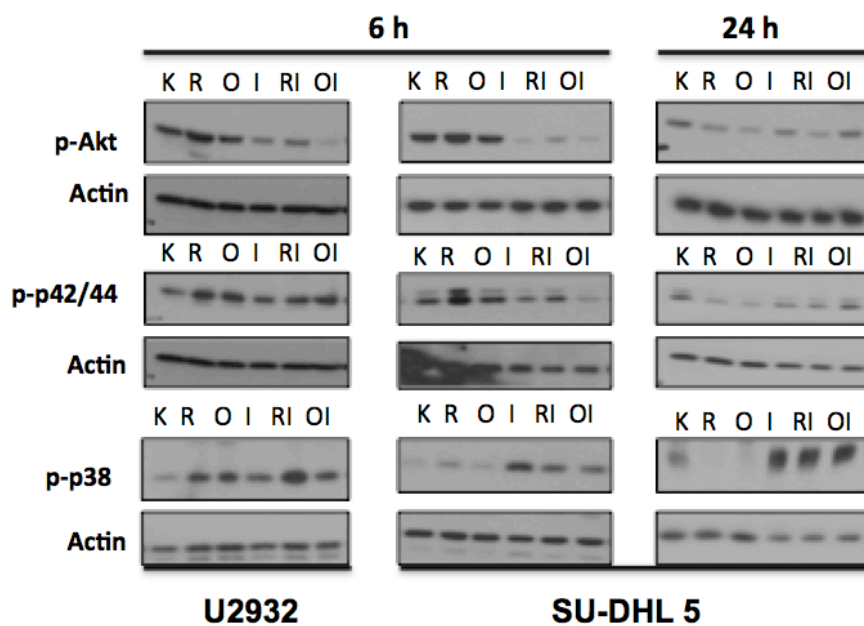


Abb. 47: Western Blot-Analysen

Komponenten der PI3K-, ERK- und p38MAPK-Signalwege der DLBCL-Zelllinie U2932 und SU-DHL 5 nach Behandlung mit Rituximab- (R), Obinutuzumab- (O) und Idelalisib-Monotherapie (I) sowie der Kombination aus Rituximab + Idelalisib (RI) und Obinutuzumab + Idelalisib (OI) nach 6 und 24 Stunden.

In Zelllinie SU-DHL5 waren die aktivierenden Effekte der Anti-CD20-Antikörper auf den PI3K- und ERK-Signalweg weniger stark ausgeprägt und in Kombination mit den PI3K-Inhibitoren überwogen die inhibierenden Effekte. Insbesondere die Kombination von Obinutuzumab und Idelalisib verursachte eine additive Inhibition der Signalwege. Die Ergebnisse der Zelllinie U2932 nach 6 Stunden Inkubation entsprachen den Ergebnissen der Zelllinie Ula (vgl. Abb 47, Seite 70).

5.4 Einfluss der Kombinationstherapie auf gesunde Lymphozyten

Potentielle zytotoxische Effekte nach Mono- und Kombinationstherapien auf gesunde Spenderlymphozyten wurden untersucht um eine Steigerung unspezifischer zytotoxischer Mechanismen auf gesunde Zellen auszuschließen. Blut eines gesunden Spenders wurde nach dessen Einwilligung entnommen, mittels Ficoll die Lymphozyten isoliert und anschließend 1×10^6 Zellen in Suspensionsplatten suspendiert. Es handelt sich somit um eine physiologische Mischung gesunder B- und T-Lymphozyten. Die Zellproben wurden mit den Anti-CD20-Antikörpern und Idelalisib in Monotherapie sowie den Kombinationen aus Anti-CD20-Antikörpern und Idelalisib inkubiert. Die Zellen wurden für 48 Stunden inkubiert und mittels Durchflusszytometrie und Annexin V-PE/7-AAD-Färbung analysiert. Beide Anti-CD20-Antikörper verursachten keine signifikanten toxischen Effekte bei gesunden Lymphozyten. Nach Behandlung mit Idelalisib zeigte sich eine geringfügige Erhöhung apoptotischer Zellen, die in Kombination mit Anti-CD20-Antikörpern leicht zunahm. Dennoch waren diese Effekte kaum signifikant und erreichten maximal 15% (vgl. Abb. 48).

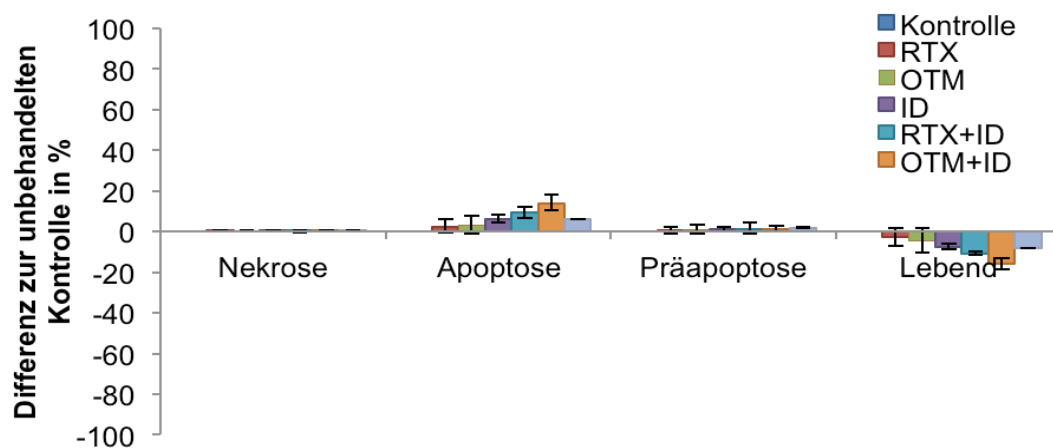


Abb. 48 : Apoptosedetektion mit Annexin V-PE und 7-AAD-Färbung

Induktion von Zelltod in normalen T- und B-Spenderlymphozyten 48 Stunden nach Behandlung mit Anti-CD-20-Antikörpern, dem PI3K-Inhibitor Idelalisib und deren Kombination. Ein Versuch in dreifacher Ausführung.

6. Diskussion

6.1 Einleitung

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom ist das häufigste Non-Hodgkin-Lymphom des Erwachsenen und umfasst eine heterogene Gruppe von Neoplasien, die in morphologische, immunphänotypische und genetische Subgruppen unterteilt werden können (1). Das DLBCL ist ein aggressives, jedoch bei einem Teil der Patienten heilbares Lymphom und in mehr als 50% der Fälle kann in der Rituximab-Ära eine Langzeitremission erzielt werden (4). Die Entdeckung des Oberflächenproteins CD20 als B-Zell-spezifisches Antigen, dessen Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten und die Tatsache, dass auch maligne Zellen CD20 exprimieren, bildete die Rationale dieses Oberflächenmolekül pharmakologisch zu inhibieren (33, 44). Die Zulassung des monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers Rituximab stellte einen erheblichen Fortschritt für die Lymphomtherapie in den 1990er Jahren dar (29). Heutzutage stellt Rituximab in Kombination mit Chemotherapie das Standardregime für viele Tumorentitäten dar (40, 51). Auch das diffus großzellige B-Zell-Lymphom wird mit Rituximab + Chemotherapie, spezifisch das R-CHOP Regime, als Erstlinientherapie behandelt (4, 111). Dennoch rezidiert eine signifikante Anzahl an Patienten und besonders diese Rezidive zeigen eine schlechte Prognose (111). Neue Therapieansätze sollen die Prognose dieser Patienten verbessern. Ein Ansatz zur Verbesserung der Therapie ist die Erforschung neuer Anti-CD20-Antikörpern mit optimierten Wirkspektren (34). Der humanisierte Typ-II monoklonale Anti-CD20-Antikörper Obinutuzumab nimmt derzeit Einzug in die Klinik und verbesserte das progressionsfreie Überleben im Follikulären Lymphom, nicht aber im DLBCL, im Vergleich zu Rituximab (59, 61). Ein weiterer Ansatz zur Erweiterung der Krebstherapie stellen „targeted therapies“, die Verwendung molekularer Inhibitoren mit gezielten, auf die Onkogenese des Tumors adaptierten, Wirkstoffen dar (112). Die Identifikation von intrazellulären Signalwegen, die eine Rolle in der Proliferation und Stoffwechselaktivität von Tumorzellen spielen, bietet Angriffspunkte für die Entwicklung neuer spezifisch wirksamer Substanzen. Einer dieser Signalwege, der eine Rolle für das Überleben und Proliferation von Tumorzellen spielt, ist der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg (66).

Dieser Signalweg ist wichtig für die Proliferation, das Überleben, das Wachstum, die Zellzyklusprogression und die Proteinsynthese von Tumorzellen (74). Der Einsatz von Inhibitoren des PI3K-Signalweges war lange durch dessen bedeutende physiologische Rolle limitiert (66). Die Identifikation der PI3K δ -Untereinheit, als für hämatologische Zellen spezifisch, hat zu der Entwicklung von Idelalisib, einem PI3K δ -spezifischen Inhibitor geführt (80). In Lymphomen ist ein chronisch aktiver PI3K-Signalweg von der p110 δ -Untereinheit abhängig (113). Inhibitoren dieser Einheit inhibieren chronisch-aktives PI3K-Signaling und zeigen Antitumoraktivität (52, 92). Der große Erfolg von Idelalisib in der Therapie der B-CLL stellt die Grundlage für die Erforschung weiterer Einsatzgebiete dar (52). Zudem hat die Erforschung möglicher Interaktionen dieser Substanzen in Kombination mit den etablierten Therapien einen großen Stellenwert zum optimalen Einsatz dieser neuen Substanzen (66). In dieser Arbeit wurden die Effekte des Typ-I monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers Rituximab, des Typ-II monoklonalen Antikörpers Obinutuzumab, des spezifischen PI3K δ -Inhibitors Idelalisib sowie des pan-PI3K-Inhibitors LY294002 zur Evaluierung etwaiger Interaktionen in DLBCL-Zelllinien untersucht.

6.2 In vitro Wirksamkeit der Anti-CD20-Antikörper

Der Typ-II monoklonale Antikörper Obinutuzumab ist der stärkere Induktor von homotypischer Adhäsion als der Typ-I-Antikörper Rituximab. Schon wenige Stunden nach Behandlung mit Obinutuzumab zeigten sich in Zelllinien makroskopisch und mikroskopisch sichtbare Zellaggregate (Abb. 11, Seite 40). Nach Rituximab-Therapie waren diese Effekte schwächer ausgeprägt nachweisbar. Dieses als homotypische Adhäsion bezeichnete Phänomen ist an der Induktion von CD20-mediertem Zelltod von Bedeutung (41). Die Induktion von homotypischer Adhäsion nach Obinutuzumab-Therapie wurde auch von anderen Autoren beschrieben (56) und konnte in dieser Arbeit an DLBCL-Zelllinien nachvollzogen werden.

Beide Anti-CD20-Antikörper reduzierten die Proliferation hauptsächlich in den ersten 24 Stunden und zeigten nur eine leichte zeitliche Progredienz. Dies beruht, wie später beschrieben, auf direkt zytotoxischen Effekten der Anti-

CD20-Antikörper (Abb. 14, Seite 43). Eine klinische Relevanz ist aus der zeitlichen Dynamik nicht abzuleiten. Wie erwartet, führte eine Steigerung der Konzentration der Anti-CD20-Antikörper zu keiner signifikanten Steigerung der Proliferationshemmung. Die Anti-CD20-Antikörper erreichen somit ihr Wirkmaximum bereits bei 1 µg/ml (Abb. 12, Seite 41; Abb. 13, Seite 42). Die Anti-CD20-Antikörper führten zu antiproliferativen Effekten. Wir untersuchten die in vitro Wirksamkeit der beiden Anti-CD20-Antikörper in DLBCL-Zelllinien mittels Proliferationsassays. Rituximab verursachte eine relevante Proliferationshemmung in 4/7 getesteten Zelllinien. Obinutuzumab reduzierte die Proliferation in 5/7 getesteten Zelllinien. Die maximale Proliferationshemmung nach Rituximab Therapie betrug ca. 40%, nach Behandlung mit Obinutuzumab 57%. Obinutuzumab reduzierte die Proliferation signifikant stärker als Rituximab in drei Zelllinien. Zwei Zelllinien waren gegenüber beiden Anti-CD20-Antikörpern resistent (Abb. 15, Seite 43). Unspezifisch toxische Wirkungen wurden anhand der CD20-negativen Zelllinie Will ausgeschlossen. Die fehlende Expression von CD20 konnte mittels Durchflusszytometrie nachvollzogen werden. Auch in anderen Arbeiten zeigte Rituximab moderate direkte antiproliferative Effekte (41). Die Überlegenheit von Obinutuzumab in Bezug auf die direkte Induktion von Zelltod wurde in anderen Arbeiten in 3D-Kulturmodellen gezeigt (53). Diese Ergebnisse bestätigen stärker ausgeprägte antiproliferative Effekte von Obinutuzumab. Um zu evaluieren, ob die antiproliferativen Effekte der Anti-CD20-Antikörper auf Alterationen im Zellzyklus oder der direkten Induktion von Zelltod beruhen, wurde dies mittels Durchflusszytometrie untersucht. Rituximab induzierte signifikanten G1-Arrest in 3/4 getesteten Zelllinien. Obinutuzumab induzierte nur in 1/4 Zelllinien zu signifikanten Zellzyklusalterationen (Abb. 16, Seite 45). Auch in der Literatur ist der Einfluss von Rituximab auf die Zellzyklusprogression beschrieben (43). Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass Typ-II Anti-CD20-Antikörper weniger Einfluss auf die Zellzyklusprogression zeigen als Typ-I-Antikörper.

Direkte, schnelle Induktion von Zelltod ist der Hauptwirkungsmechanismus von Anti-CD20-Antikörpern in vitro. Obwohl es zu Zellzyklusalterationen kam, korrelierte deren Ausmaß nicht mit der Stärke der Proliferationshemmung. Zudem zeigte die Analyse der zeitlichen Kinetik, dass beide Anti-CD20-

Antikörper, in sensiblen Zelllinien, die Zellzahl bereits während der ersten Stunden nach Inkubation stark reduzierten (Abb. 14, Seite 43). Diese Faktoren geben Hinweise auf direkt zytotoxische Effekte. Die Induktion von Zelltod wurde mittels Annexin V/7-AAD-Färbung und Durchflusszytometrie untersucht. In sensiblen Zelllinien führten beide Anti-CD20-Antikörper zur signifikanten Reduktion viabler Zellen. In der absoluten Reduktion viabler Zellen war Obinutuzumab effektiver als Rituximab, die Unterschiede erreichten nicht in allen Zelllinien Signifikanzniveau (Abb. 20, Seite 48). Betrachtet man den Untergang der Zellen differenziert, fällt auf, dass die Zellen insbesondere nach Behandlung mit Obinutuzumab kaum Präapoptose charakterisiert durch DNA-Fragmentierung und Bindung von Annexin V, sondern primär durch eine gestörte Zellpermeabilität charakterisiert durch 7-AAD-Bindung, auffallen. Nach Rituximab-Behandlung hingegen kommt es zu Präapoptose (Abb. 17, Seite 46; Abb. 18, Seite 47). Direkte zytotoxische Effekte von Anti-CD20-Antikörpern werden in der Literatur als Induktion von PCD (programmed cell death) bezeichnet (35). Der genaue Mechanismus der CD20-induzierten Apoptose ist umstritten und abhängig vom verwendeten Antikörper, dem genetischen Hintergrund der verwendeten Zellen, dem Versuchsmodell sowie der Anwesenheit von „Crosslinking“-Antikörperfragmenten (51). Calcium-Freisetzung und Induktion von Apoptose in B-Zellen konnte nach Rituximab-Therapie gezeigt werden (114). Die zytotoxische Potenz von Rituximab konnte durch die Addition von Antikörperfragmenten, die zu „Crosslinking“ der Antikörper führen, deutlich verstärkt werden. In vivo könnte Crosslinking durch Fc-Rezeptor-assoziierte Zellen vermittelt werden (39, 49, 114). Byrd et al. konnten schließlich signifikante Spaltung von Caspasen und apoptotische Effekte auch in vivo nachweisen (49). Chan et al. hingegen untersuchten die Wirkung von Anti-CD20-Antikörper ohne Crosslinking und beschreiben einen nicht-apoptotischen, Caspase-unabhängigen Mechanismus der Zelltodinduktion. Auch in diesen Arbeiten kam es zur Spaltung von Caspase 3, dies war jedoch nicht für die Induktion von Zelltod verantwortlich (41). Diese Arbeit lässt über sowohl mitochondriale, Caspase-abhängige Apoptose als auch für nicht-apoptotische Induktion von Zelltod nach Therapie mit Anti-CD20-Antikörpern spekulieren. Caspase-unabhängige Wirkmechanismen können erklären, warum die Zellen primär durch Verlust der Zellintegrität und nicht

durch DNA-Fragmentierung auffallen. Dies wurde nach Rituximab-Behandlung auch von anderen Autoren in vivo beobachtet und passt zu den beschriebenen nicht-apoptotischen Mechanismen (41). Dennoch kam es auch zu einem leichten Zuwachs präapoptotischer Zellen. Beide Antikörper induzierten die Spaltung von Caspasen (Abb. 20, Seite 48). Dies würde für eine Beteiligung mitochondrialer, Caspase-abhängiger Mechanismen sprechen und für eine Überschneidung mit Mechanismen nach Behandlung mit Rituximab und Crosslinking-Fragmenten (48). Auf Genexpressionsebene induzierten beide Anti-CD20-Antikörper EGR1. EGR1 führt zur Herunterregulierung von BIRC5 und induziert Caspasenaktivität und Apoptose (47).

Für den Typ-II monoklonalen Antikörper Obinutuzumab wurde ein Mechanismus, unabhängig von Caspasen, BCL-2 und dem klassischen Apoptosemechanismus, beschrieben. Dieser Mechanismus induziert Zelltod über Actin-Reorganisation, Degradation von Lysosomen und einen neuen „reactive oxygen species“-Signalweg (56). Nach Behandlung mit Obinutuzumab kommt es kaum zum Anstieg Annexin V-positiver präapoptischer Zellen, aber zur massiven Steigerung der 7-AAD-positiven-Zellpopulationen. Dies könnte als Zeichen lysosomalen Zelltodes interpretiert werden. Obinutuzumab führte zur Spaltung der Caspasen 3 und 9. Dies könnte auf eine Beteiligung apoptotischer Mechanismen hinweisen. Die Rolle der Caspasen als Effektormechanismus, oder Nebenprodukt des nicht-apoptotischen Zelltodes könnte durch Kombination der Anti-CD20-Antikörper mit Caspasehemmstoffen weiter untersucht werden.

Der Typ-II monoklonale Anti-CD20-Antikörper Obinutuzumab hat die Fähigkeit CD20 in cholesterinreiche Membrandomänen (sog. lipid rafts) zu relokalisieren verloren. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Relokalisierung von CD20 nach Behandlung mit Typ-I-Antikörpern (115) und damit assoziierten Veränderungen im Signalverhalten sowie daraus resultierenden apoptotischen Mechanismen gezeigt werden (116). Der Verlust der Fähigkeit zur Relokalisierung und damit assoziierter Signaltransduktion könnte Unterschiede im apoptotischen Verhalten der Typ-I und Typ-II-Antikörper begründen.

Ein weiterer Unterschied besteht im Ausmaß der homotypischen Adhäsion nach CD20-Therapie. Obinutuzumab ist der stärkere Induktor von Zellaggregation und möglicherweise damit assoziiertem Zelltod. Ob es sich bei der

Zellaggregation lediglich um ein phänomenologisches Ereignis handelt ist unklar.

Beide Antikörper beeinflussen die intrazellulären Signalkaskaden PI3K, ERK1/2 und p38 MAPK (Abb. 23, Seite 51). Es konnten sowohl aktivierende als auch inhibitorische Effekte auf diese Signalkaskaden gezeigt werden. Die Behandlung mit Rituximab induzierte in den ersten Stunden eine deutlich stärkere Phosphorylierung von AKT, ERK1/2 und der p38 MAPK als in unbehandelten Kontrollen. Obinutuzumab induzierte diese Effekte deutlich schwächer. Hierbei korrelierte zeitlich die Induktion eben genannter Signalkomponenten mit den PCD-Effekten der Antikörper. Dies könnte für eine Beteiligung der p38 MAPK, ERK1/2- oder PI3-Kinase in CD20-mediierter Apoptose sprechen.

Heinrich et al. zeigten die Alteration der Gene EGR1, DUSP2, NFATC1 und NFKBIE. EGR1 ist Bestandteil der BCR-Signalkaskade, DUSP2 gehört zum ERK-Signalweg und NFATC1 sowie NFKBIE sind mit dem PI3K-Signalweg assoziiert (47). Dies könnte das genetische Korrelat der hier dargestellten Ergebnisse darstellen.

Aktivierende Effekte auf den ERK1/2 und p38-Signalwege wurden auch in anderen Arbeiten beschrieben (45, 50). Dort wurden diese Effekte jedoch nach Behandlung mit Rituximab und Crosslinking-Antikörpern beschrieben. Die Induktion der p38- und ERK1/2-Proteine in dieser Arbeit in Abwesenheit von Faktoren, die Crosslinking verursachen, gibt weitere Hinweise, dass Gemeinsamkeiten des Einflusses der CD20-Antikörper auf intrazelluläre Signalwege mit und ohne Crosslinking existieren könnten. Pedersen et al. beschreiben einen Mechanismus der Apoptoseinduktion nach Rituximab-Behandlung der abhängig von der Induktion der p38 MAPK ist (45). Die p38-MAPK besitzt die Fähigkeit das antiapoptotische Protein BCL-2 durch Phosphorylierung negativ zu regulieren. Dies führt zu einer Verringerung der antiapoptotischen Potenz von BCL-2 und stellt einen wichtigen Mechanismus der Apoptoseinduktion unter zellulärem Stress dar (117).

Eine Herunterregulierung von BCL-2 führt zur Erhöhung von pro-apoptotischen Signalmolekülen wie Bax und Bak (118). In der vorgelegten Arbeit konnte eine Erhöhung des pro-apoptotischen Proteins BAX nach Rituximab-Therapie nachgewiesen werden (Abb. 20B, Seite 48).

Eine Beteiligung der p38 MAPK in Signalalterationen nach Behandlung mit Rituximab-Monotherapie und Behandlung mit RTX und Crosslinking ist möglich. Die Rolle der p38 MAPK in CD20-medierter Apoptose könnte durch die Kombination der Antikörper mit selektiven Inhibitoren der p38 MAPK weiter untersucht werden.

Die basale Expression von BCL-2 in den verwendeten Zelllinien wurde untersucht. Zwei Zelllinien mit fehlender BCL-2-Expression zeigten nur schwaches (SU-DHL5) oder kein Ansprechen (HT) auf Anti-CD20-Therapie. Die zwei Rituximab-sensiblen Zelllinien (U2932, Ula) zeigten eine hohe Expression von BCL-2 (Abb. 21, Seite 49). Interessanterweise zeigte sich dieselbe Relation nach Behandlung mit Obinutuzumab, obwohl für Obinutuzumab ein BCL-2 unabhängiger Mechanismus der Zelltodinduktion beschrieben ist. BCL-2 könnte somit eine Rolle bei den Wirkmechanismen von Rituximab und Obinutuzumab oder ein allgemeinen Faktor, der zu einem Überlebensvorteil von Zellen führt, darstellen. Auf Genexpressionsebene führte Rituximab, aber nicht Obinutuzumab zur Herunterregulierung von BCL2A1 (47).

Der Einfluss von BCL-2 auf die Wirkung der Anti-CD20-Antikörper ist noch nicht vollends verstanden. Eine hohe BCL-2-Expression ist mit Resistenz gegenüber Rituximab assoziiert (51). Die Transfektion von BCL-2 in CD20-sensible Zelllinien konnte die zytotoxischen Effekte von CD20-Antikörpern vermindern (41). Allerdings ist auch die Abwesenheit von BCL-2 in anderen Arbeiten als Ursache für Resistenz gegenüber Rituximab beschrieben. Immuno-resistenz konnte durch die Inhibition von Bax, Bak oder BCL-2 erreicht werden (119).

Auch klinische Daten legen eine duale Rolle von BCL-2 nahe. In Abwesenheit des Proteins bringt Rituximab + CHOP keinen klinischen Vorteil (120). Eine Erklärung der aktivierenden Effekte der Anti-CD20-Antikörper auf die PI3K- und ERK1/2-Überlebenssignalwege stellt die Aktivierung dieser Signalwege als Gegenregulationsmechanismus dar. Die PI3K- und ERK1/2-Signalwege sind bedeutend für das Überleben von Tumorzellen (121, 122). Eine Aktivierung dieser Signalwege als Reaktion auf zytotoxische Effekte der Anti-CD20-Antikörper ist nicht auszuschließen. Allerdings traten die aktivierenden Effekte auch in nicht-sensiblen Zelllinien auf, was gegen eine Reaktion auf Zelltodinduktion spricht. Dennoch könnte die Hochregulierung dieser Überlebenssignalwege zur Resistenz gegenüber Rituximab beitragen und die

relativ schwach ausgeprägte Proliferationshemmung erklären. Die schwächer ausgeprägte Aktivierung der Überlebenssignalwege nach Behandlung mit Obinutuzumab könnte dessen stärker ausgeprägte antiproliferative Effekte erklären. Über die Rolle der ERK1/2-Induktion nach CD20-Therapie könnten Kombinationen mit ERK1/2-Inhibitoren weiteren Aufschluss bringen. An Hand des Interaktionsmechanismus könnten Vermutungen über die Rolle der ERK1/2-Induktion als Effektormechanismus oder Überlebensstrategie der Zelle nach CD20-mediierter Zytotoxizität gemacht werden.

In den nicht-sensiblen Zelllinien SU-DHL5 und HT führten beide Anti-CD20-Antikörper zu einer Inhibition der PI3K- und ERK-Signalwege über 24 und 48 Stunden nach Inkubation mit Rituximab oder Obinutuzumab. Hierbei zeigte Obinutuzumab eine stärker ausgeprägte Inhibition des PI3K- und ERK-Signalweges (Abb. 23, Seite 51). Die inhibitorischen Effekte auf die PI3K- und ERK-Überlebenssignalwege traten erst spät auf und spielen vermutlich in der schnell induzierten, CD20-medierten Zytotoxizität keine Rolle. Sie könnten allenfalls die leichte Progredienz der Proliferationshemmung erklären. Die Inhibition einer Reihe von intrazellulären Signalkaskaden wie PI3K, ERK1/2, p38-MAPK, STAT3 oder NF- κ B nach Behandlung mit Rituximab wurde von Bonavida et al. umfangreich untersucht und als Schlüsselmechanismen der CD-20-medierten Chemosensibilisierung postuliert (123). Rituximab induzierte Chemosensibilisierung durch die Alteration mehrerer intrazellulärer Signalkaskaden und subsequente Inhibition von anti-apoptotischen Genprodukten. In vitro inhibierte Rituximab die IL-10 und BCL-2-Expression über Inhibition des p38 MAPK-Signalweges (124, 125). In anderen Zelllinien inhibierte Rituximab das antiapoptotische Protein BCL-XL über die NF- κ B-, ERK1/2- und PI3K-Signalwege und führte zur Chemosensibilisierung jedoch nicht zu zytotoxischen Effekten (29, 126-128). Der Einfluss auf Chemosensibilisierung wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Kombinationsexperimente mit Chemotherapeutika könnten weiteren Aufschluss bringen.

Zusammenfassend zeigten sich in dieser Arbeit sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede der Effekte von Obinutuzumab und Rituximab. Dies bestätigt die Ergebnisse von Genexpressionsanalysen. 29 Gene wurden nur durch

Rituximab verändert, 21 Gene nur durch Obinutuzumab und 21 Gene wurden gemeinsam dereguliert (47).

6.3 In vitro Wirksamkeit von Inhibitoren der PI3-Kinase

Die verwendeten DLBCL-Zelllinien exprimieren die PI3K δ -Untereinheit und zeigen aktives PI3K-Signaling (Abb. 24, Seite 52). Inhibitoren der PI3-Kinase führten zur zeit- und dosisabhängiger Proliferationshemmung in DLBCL-Zelllinien. Die antiproliferative Wirkung des selektiven PI3K δ -Inhibitors Idelalisib und des Pan-PI3K-Inhibitors LY294002 wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstests in DLBCL-Zelllinien untersucht. Die Proliferationshemmung der PI3K-Inhibitoren verminderte das Zellwachstum progredient mit steigender Dosis. Eine Dosis von 20 μ M inhibierte das Zellwachstum in 4/8 Zelllinien (50%) um mehr als 40% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. In den anderen vier Zelllinien induzierten die Inhibitoren ein geringes Ansprechen (Abb. 25, Abb. 26, Seite 53). Dies zeigt eine zelllinienspezifische Sensibilität gegenüber PI3K-Inhibitoren und lässt über zugrunde liegende Mutationen spekulieren. Die Zelllinien HBL-1 als sensible und U2932 als nicht-sensible Zelllinie wurden auch von anderen Gruppen untersucht. Hier konnte bei Zelllinien HBL-1 eine Mutation von CD79b als Ursache der Sensibilität gegenüber PI3K-Inhibitoren identifiziert werden (76). Auch eine NF- κ B-abhängige Subgruppe von ABC-DLBCL konnte als Untergruppe mit großer Sensibilität gegenüber PI3K-Inhibition gezeigt werden (76). Die Erforschung weiterer molekularer und genetischer Marker, welche die Wirkung von PI3K-Inhibitoren beeinflussen, stellt ein wichtiges Forschungsfeld für die Zukunft dar um diese teuren Substanzen gezielt einsetzen zu können (129). Während sich nach 24 Stunden kaum Inhibition des Zellwachstums zeigte, zeigte sich eine signifikante Proliferationshemmung vor allem nach 48 und 72 Stunden (Abb. 28, Seite 54). Die PI3-Kinase vermittelt eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege und beeinflusst über direkte und indirekte Effekte durch Alterationen der Proteinsynthese das Überleben von normalen und malignen Zellen. Die Aktivierung dieses Signalweges ist ein wichtiger Mechanismus in der Reaktion auf zellulären Stress (66). Möglicherweise trägt steigender zellulärer Stress unter steigenden Zellzahlen und Verbrauch von Nährmedium in diesen

Versuchsansätzen zu dem zeitlich progredienten Verlauf der Proliferationshemmung bei, und der späte Wirkeintritt ist durch Sensibilisierung der Zellen gegenüber pro-apoptotischen Stimuli zu interpretieren. Die zeitliche Verzögerung könnte auch durch die Dauer bis zum Eintritt der Veränderungen auf transkriptioneller und translationeller Ebene begründet sein. Der Pan-PI3K-Inhibitor LY294002 führte zu einer stärkeren Proliferationshemmung als Idelalisib (Abb. 29, Seite 55). Auch andere PI3K-Untereinheiten neben PI3K δ tragen zum Überleben von Tumorzellen bei. Der pan-PI3K-Inhibitor LY294002 inhibiert neben PI3K δ auch die α - und β -Untereinheiten. Eine weitere Erklärung für die bessere Wirkung von LY294002 wäre die Inhibition anderer off-target Zielstrukturen wie der mTOR-Komplex (94). Kombination von mTOR- und PI3K-Inhibition reduzierte die Proliferation von Tumorzellen effektiver als PI3K-Inhibition allein (79). Inhibition des PI3K-Signalweges führte zur Erhöhung des Anteils der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (Abb. 30, Seite 56). Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die Alterationen des Zellzyklus nach Therapie mit Idelalisib in CLL-Zelllinien zeigten (80). Der PI3K-Signalweg trägt über AKT und p21kip direkt zur Zellzyklusprogression bei (72). Darüberhinaus induzierten beide PI3K-Inhibitoren signifikante, dosisabhängige Apoptose (Abb. 31, Abb. 32, Seite 57). Die antiproliferative Wirkung der PI3K-Inhibitoren beruht somit auf einer Kombination von G1-Arrest und Induktion von Apoptose. Zudem konnte die Spaltung von Caspasen nachgewiesen werden (Abb. 33, Seite 58). Die PI3K-Inhibitoren verursachen Zelltod durch den klassischen, Caspase-abhängigen, apoptotischen Mechanismus (92). Diese Arbeit bestätigt die Induktion von G1-Arrest und Apoptose als Wirkmechanismus von PI3K-Inhibitoren im DLBCL. Interessanterweise trat die Apoptose nach PI3K-Inhibition nicht sofort, sondern zeitlich versetzt auf (Abb. 34, Seite 59). Die Ursache für die progrediente Proliferationshemmung ist somit auf spät einsetzende, apoptotische Effekte zurückzuführen. Auf Proteinebene inhibierten beide Inhibitoren p-AKT, p-ERK1/2 über 1, 6 und 12 Stunden nach Behandlung deutlich. Western Blot-Analysen von phosphoryliertem AKT und ERK1/2 als Schlüsselkinasen der zuvor genannten Signalwege ist schon wenige Stunden nach Behandlung mit PI3K-Inhibitoren nicht mehr nachweisbar. Beide Wirkstoffe inhibieren somit signifikant den PI3K/AKT/mTOR- und ERK1/2-Überlebenssignalweg (Abb. 35, Seite 60). Der ERK1/2-Signalweg wurde als

Downstream-Ziel von PI3K etabliert und erklärt die Beeinflussung beider Signalwege (72). Darüberhinaus ist die duale Inhibition der PI3K- und ERK-Signalwege notwendig um schnelle Induktion von Apoptose durch PI3K-Inhibitoren auszulösen (130). Die gleichzeitige Inhibition der PI3K- und ERK1/2-Signalwege sowie Apoptoseinduktion konnte in dieser Arbeit in der Zelllinie SU-DHL 5 beobachtet werden.

Idelalisib vermittelte eine kürzere inhibitorische Wirkung auf die Überlebenssignalwege als LY294002, und die Phosphorylierung von PI3K- und ERK-Signalkomponenten begann über 24 und 48 Stunden wieder zu steigen. Nach Behandlung mit LY294002 blieb dieser Wiederanstieg aus (Abb. 36, Seite 60). Möglicherweise kann die Tumorzelle nach selektiver PI3K δ -Inhibition andere PI3K-Untereinheiten aktivieren, um den PI3K-Signalweg wieder zu aktivieren und damit ihr Überleben zu sichern. Dieser Wiederanstieg nach Therapie mit Idelalisib könnte die signifikant schlechtere Wirksamkeit des Inhibitors im Vergleich zu LY294002 nach 72 Stunden erklären. Eine andere Ursache könnten mögliche off-target Zielstrukturen von LY294002 sein, die zusätzlich zur Proliferationshemmung beitragen (129).

Interessanterweise kam es auch nach PI3K-Inhibition zur Phosphorylierung und Induktion der p38 MAPK (Abb. 35, Seite 60). Der Einfluss von PI3K-Inhibitoren auf den p38 MAPK-Signalweg ist kaum untersucht. Die Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges könnte ebenfalls eine Art Feedback-Mechanismus oder einen spezifischen Effekt PI3K-Inhibitoren darstellen. Die Rolle der p38 MAPK in PI3K-vermittelter Apoptose könnte durch Kombinationsexperimente mit Inhibitoren dieser Kinase weiter evaluiert werden.

6.4 Kombination von Anti-CD20-Antikörpern und PI3K-Inhibitoren

Die Kombination von PI3K-Inhibitoren mit Anti-CD20-Antikörpern zeigte eine zelllinienabhängige Interaktion. Die Kombination von Rituximab und Idelalisib induzierte in 1 von 6 getesteten Zelllinien (SU-DHL 5) eine signifikant stärkere Proliferationshemmung als die jeweils wirksamste Monotherapie (Abb. 38, Seite 63). Die Kombination von Obinutuzumab und Idelalisib reduzierte das Zellwachstum in 3 von 6 Zelllinien (Ula, SU-DHL 5, U2932) signifikant stärker

als die jeweilig effektivste Monotherapie (Abb. 37, Seite 62; Abb. 38, Seite 63; Abb. 39, Seite 63). In allen anderen Zelllinien entsprach die Proliferationshemmung der Kombinationstherapie der effektivsten Monotherapie. Die Ergebnisse der Kombinationen Rituximab + LY294002 sowie Obinutuzumab + LY294002 korrelierten mit den Kombinationen mit Idelalisib. Alle Zelllinien waren entweder gegenüber Anti-CD20-Antikörpern oder PI3K-Inhibitoren sensibel. Die Kombinationstherapien führten somit in allen getesteten Zelllinien zu einer signifikanten Proliferationshemmung und damit zu einem breiteren Ansprechen der DLBCL-Zelllinien als die Monotherapien (Abb. 49, Seite 84). Dies könnte sich in vivo mit einer besseren Ansprechrate zeigen. Die Analyse der Interaktionen mit dem „fraction of product“ zeigte nach 72 Stunden in 7 von 9 getesteten Zelllinien eine additive Proliferationshemmung. In zwei Zelllinien (Ula, SU-DHL 4) zeigte sich eine antagonistische Interaktion (Abb. 40, Seite 64).

Die beobachteten additiven Effekte könnten ein Ergebnis der zeitlichen Interaktion sein. Die Antikörper induzieren nur in einer Subpopulation Apoptose und die überlebenden Zellen proliferierten weiter. Im Gegensatz dazu führte PI3K-Inhibition zu dosisabhängiger und zeitlich progredienter Zellreduktion. Dies wurde auch von anderen Autoren beobachtet (41). Die additiven Effekte in der Kombinationstherapie entstehen möglicherweise durch eine zeitliche Interaktion der schnell wirkenden Anti-CD20-Antikörper und der zeitlich progredient wirkenden PI3K-Inhibitoren.

Unterschiede in der Interaktion der Wirkstoffgruppen in verschiedenen Zelllinien legen Überschneidungen oder komplexe Interaktionen der Wirkmechanismen von Anti-CD20-Antikörpern und PI3K-Inhibitoren nahe. Gemeinsamkeiten von BCR- und CD20-vermittelter Apoptose und korrelierende Sensibilität von Zelllinien konnte von Mathas et al. (50) gezeigt werden. In anderen Arbeiten wurde diese Korrelation allerdings nicht beobachtet (41). In der vorgelegten Arbeit zeigte sich keine Korrelation zwischen der Sensibilität gegenüber Anti-CD20-Therapie und PI3K-Inhibition. Dies legt unabhängige Wirkmechanismen nahe.

In zwei Zelllinien zeigte sich eine antagonistische Interaktion. Insbesondere die schnell induzierte Verringerung der Zellzahl durch Anti-CD20-Antikörper wurde durch die Kombinationstherapie reduziert. Hierbei zeigte sich eine nahezu

komplette Antagonisierung der Rituximab-Wirkung. Der Effekt von Obinutuzumab wurde nur teilweise aufgehoben.

DLBCL		Sensibilität gegenüber			
Zelllinien		Rituximab	Obinutuzumab	Idelalisib	CD20+ID
GCB	Ula	++	++	++	++
	SU-DHL4	+	+	-	+
	SU-DHL5	-	+	++	++
	HT	-	-	+	+
	Will-2	-	-	+	+
ABC	U2932	++	++	-	++
	HBL-1	-	+	+	+

Abb. 49: Übersicht über die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen

Sensibilität gegenüber Rituximab-, Obinutuzumab- und Idelalisib-Monotherapie und Interaktion (48 Stunden nach Behandlung) in 7 DLBCL-Zelllinien. Antagonistische Effekte sind rot, additive Effekte grün hinterlegt.

Obwohl sich uneinheitliche Ergebnisse zeigten, verschob sich im Verlauf über 48 und 72 Stunden sich die Interaktion zu additiven Effekten. In Zelllinie SU-DHL4 zeigten sich nach 72 Stunden additive Effekte. In Zelllinie Ula blieb die antagonistische Interaktion erhalten (Abb. 37, Seite 62). Dabei spielte es keine Rolle welcher Anti-CD20-Antikörper und welcher PI3K-Inhibitor verwendet wurde.

Möglicherweise bringt die Translokation t(14;18) genetische Veränderungen mit sich, die antagonistische Interaktionen zwischen den Medikamentengruppen verursachen. Die beiden Zelllinien mit antagonistischer Interaktion wiesen diese Translokation auf. DLBCL mit Translokation t(14;18) sind eine spezifische Untergruppe von DLBCL die zu einem IGH-BCL-2 Rearrangement und damit zu einer Dysregulation von BCL-2 führt (131). Ein kausaler Zusammenhang wurde in dieser Arbeit nicht hergestellt.

Die Interaktion der Anti-CD20-Antikörper und PI3K-Inhibitoren beruht auf Interaktion der Zelltod-/Apoptoseinduktion.

Die Interaktion der beiden Medikamentengruppen wurde auf Zellzyklus- und Zelltod-Ebene untersucht. Während sich im Zellzyklus keine signifikanten

Interaktionen der beiden Wirkstoffgruppen zeigten (Abb. 41, Seite 65), konnte eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der Viabilitätsassays und den Ergebnissen der AnnexinV/7AAD-Zytometrie gezeigt werden.

In Zelllinie Ula, die eine antagonistische Interaktion aufwies, beruhten die antagonistischen Effekte auf einer Verringerung des direkt induzierten Zelltodes der Anti-CD20-Antikörper. Dieser Antagonismus war in der Kombination von Rituximab + PI3K-Inhibitor stärker ausgeprägt als bei der Kombination von Obinutuzumab mit einem der beiden PI3K-Inhibitoren. Es spielte hierbei keine Rolle, ob mit Idelalisib oder LY294002 kombiniert wurde. Zu späteren Zeitpunkten kam es zu einer additiven Verringerung viabler Zellen nach Kombinationstherapie (Abb. 42, Seite 66). Dies lässt Spekulationen über zwei unterschiedliche, zeitabhängige Interaktionsmuster zu. Zum einen eine Verringerung des CD20-medierten, direkten Zelltodes, die nur in einer Untergruppe von DLBCL-Zelllinien auftritt. Zum anderen additive zytotoxische Effekte, welche ein allgemeineres Phänomen zu sein scheinen. In den Zelllinien U2932 und SU-DHL 5 korrelierten die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit denen der Proliferationsanalysen. Es kam zu keiner signifikanten Abweichung der Kombinationstherapien zur effektivsten Monotherapie (Abb. 43, Seite 67; Abb. 44, Seite 68).

Die Anti-CD20-Antikörper führten im Vergleich zu den PI3K-Inhibitoren nur zu einer schwachen Caspaseaktivität (Abb. 45, Seite 68). Die Stärke der zytotoxischen Effekte nach Behandlung mit Anti-CD20-Antikörpern und PI3K-Inhibitoren korrelierte somit nicht mit der Aktivität von Caspasen. Dies bringt zusätzliche Evidenz, dass obwohl es nach Behandlung mit Anti-CD20-Antikörpern zur Aktivierung von Caspasen kam, das Ausmaß des induzierten Zelltodes nicht ausschließlich durch den klassischen Apoptosemechanismus erklärt werden kann und nicht-apoptotische Induktion von Zelltod eine wichtige Rolle spielt.

Auf Proteinebene antagonisiert die Kombinationstherapie die Rituximab-induzierte Aktivierung des PI3K-Signalweges. In Kombination mit Obinutuzumab zeigt sich eine Tendenz zu additiver Inhibition der Signalwege.

Die Induktion der PI3K- und ERK-Signalwege nach Behandlung mit Rituximab wird in Kombination mit PI3K-Inhibitoren abgeschwächt, allerdings sind AKT und ERK1/2 stärker phosphoryliert als nach PI3K-Inhibition allein. Dies könnte

erklären, warum die additiven Effekte der Proliferationshemmung nicht stärker ausgeprägt sind.

Nach Kombination von Obinutuzumab mit PI3K-Inhibitoren zeigte sich eher eine additive Inhibition der eben genannten Signalwege. Dies könnte eine Ursache für die stärker ausgeprägten antagonistischen Effekte in der Kombination Rituximab + PI3K-Inhibitoren darstellen. Die inhibitorischen Effekte der PI3K-Inhibitoren überwogen. Die Effekte der Anti-CD20-Antikörper sind im Vergleich zu den PI3K-Inhibitoren schwach ausgeprägt (Abb. 46, Seite 69). Inhibierende Effekte der Anti-CD20-Antikörper auf die PI3K- und ERK1/2-Signalwege wurden von Bonavida et al. gezeigt (44). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass diese nach Therapie mit Obinutuzumab stärker ausgeprägt sind als nach Rituximab. Zuvor wurde die Aktivierung der PI3K- und ERK1/2-Signalwege nach Behandlung mit Anti-CD20-Antikörpern als Gegenregulationsmechanismus diskutiert. Die Verringerung dieser Signalwegaktivierung in Kombination mit PI3K-Inhibitoren könnte die additiven Effekte in den Proliferations- und Zelltodanalysen erklären.

In Zelllinie Ula blieben die aktivierenden Effekte auf den ERK1/2-Signalweg nach Behandlung mit den Anti-CD20-Antikörpern auch in den Kombinationstherapien erhalten (Abb. 46, Seite 69). Weitere Versuche mit der Kombination von Anti-CD20-Antikörpern mit Inhibitoren des ERK-Signalweges sowie Inhibitoren des p38 MAPK-Signalweges könnten Aufschluss über die Auswirkungen der verschiedenen Signalwege auf das Überleben der Tumorzellen bringen.

Nach Kombinationstherapie kam es zur additiven Phosphorylierung der p38 MAPK (Abb. 47, Seite 70). Falls die Aktivierung der p38 MAPK nach Anti-CD20-Antikörpern oder PI3K-Inhibitoren über BCL-2 und Bax zu der Induktion von Zelltod beiträgt, könnte dies ebenfalls zur additiven Wirkungsverstärkung der Medikamente führen. In diesem Falle wären in Kombination mit p38 MAPK-Inhibitoren antagonistische Effekte zu erwarten.

Der Einfluss der Kombinationstherapie auf Chemosensibilisierung wurde nicht untersucht. Versuche mit der Kombination von Anti-CD20-Antikörpern, PI3K-Inhibitoren und Chemotherapeutika könnten weiteren Aufschluss bringen. Die Addition von PI3K-Inhibitoren zur Immunochemotherapie könnte über die Antagonisierung möglicher Escape-Mechanismen sowie durch additive

Inhibition des Zellwachstums und möglicherweise Chemosensibilisierung zu einer Verbesserung der Prognose von DLBCL-Patienten beitragen. Mögliche antagonistische Interaktionen sollten jedoch bedacht werden. Erste klinische Studien untersuchten Idelalisib in Kombination mit Rituximab und Bendamustin. Diese Kombination verbesserte in einer kleinen Phase-3 Studie die Prognose von B-CLL-Patienten (132).

Die Effekte der Mono- und Kombinationstherapien auf normale T- und B-Spenderlymphozyten wurden untersucht. Es zeigte sich keine signifikante Beeinträchtigung der Viabilität gesunder Lymphozyten (Abb. 48, Seite 71). Dies spricht für eine tumorselektive Wirksamkeit und kaum unspezifisch-toxische Effekte der getesteten Medikamente und deren Kombinationen oder für eine selektive Wirkung auf proliferierende Zellen.

6.5 Limitationen dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich direkt zytotoxische Effekte der Anti-CD20-Antikörper untersucht. In vivo spielen eine Reihe anderer Mechanismen eine bedeutende Rolle. Effekte wie ADCC, CDC und passive Immunisierungsmechanismen wurden nicht betrachtet. Inwieweit die PCD- und CDC-Mechanismen in vivo von Bedeutung sind, wird diskutiert (36). Studien legen nahe, dass insbesondere die Antikörper-vermittelten zytotoxischen Effekte der Anti-CD20-Antikörper den wichtigsten Wirkmechanismus in vivo darstellt (36). Andere Arbeiten haben diese Effektormechanismen in Kombination mit PI3K-Inhibitoren beachtet. PI3K-Inhibitoren antagonisierten die ADCC-Effekte von Anti-CD20-Antikörper (133). Möglicherweise inhibiert Idelalisib die Aktivität der Effektorzellen, die ADCC-Effekte vermitteln (134). Weitere Arbeiten bestätigten dies und zeigten, dass BCR-Inhibitoren die Rituximab-vermittelte Antitumorwirkung von Makrophagen und NKZ vermindern (135, 136). In dieser Arbeit wurden keine Crosslinking-Fragmente verwendet. Es gibt Hinweise, dass Crosslinking in vivo durch FC-Rezeptor-vermittelnde Zellen stattfindet. Es konnten Unterschiede der vermittelten Signale zwischen Rituximab mit und ohne Crosslinking gezeigt werden (48). Inwieweit sich Crosslinking auf die vermittelten Signalevents auswirkt, und ob beobachtete Interaktionsmechanismen in diesem Setting abgeschwächt oder verstärkt

werden könnten, ist unklar. Der CD20-Rezeptor beeinflusst als Calcium-Kanal ein großes Spektrum intrazellulärer Mechanismen und Signalwege (44, 137). In dieser Arbeit wurden lediglich die PI3K-, ERK1/2- und p38 MAPK-Signalwege untersucht. Ob die Ergebnisse auf Proteinebene überhaupt in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Proliferations- und Apoptoseanalysen stehen, ist unklar. Anti-CD20-Antikörper beeinflussen eine Vielzahl intrazellulärer Ereignisse und die Interaktion der beiden Wirkstoffgruppen könnte auch auf anderen, hier nicht untersuchten Mechanismen beruhen. Weitere Signalwege wie z.B. WNT oder STAT könnten Einfluss auf die Interaktionsmechanismen haben. In dieser Arbeit ergaben sich Hinweise aber keine klare Evidenz für die oben beschriebenen Interaktionsmuster. Zukünftige Forschung wird weiteren Aufschluss über die Interaktionsmechanismen und die zugrunde liegenden genetischen Alterationen bringen. Die Identifikation von Patienten, die von verschiedenen Kombinationstherapien profitieren, ist ein wichtiges Feld der zukünftigen Forschung. Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist die genetische Heterogenität und geringe Zahl der verwendeten Zelllinien. Im Hintergrund dieser multiplen genetischen Alterationen und möglichen Einfluss der Genetik auf die Interaktionsmuster macht die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse schwierig. So könnte die antagonistische Interaktion der zwei t(14;18)-translozierten Zelllinien in molekulargenetischem Zusammenhang stehen oder in anderen genetischen Gemeinsamkeiten der Zelllinien begründet sein. Darüberhinaus limitieren mögliche Selektions- und methodische Fehler die Aussagekraft der Proteinanalysen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme für die Western Blot-Analysen sind in den sensiblen Zelllinien ein signifikanter Anteil der Zellen apoptotisch, die aktivierenden Effekte auf die Überlebenssignalwege könnten somit ein Selektionsfehler sein. Möglicherweise erfassten die Analysen gerade die Zellen, die durch Aktivierung der Überlebenssignalwegen dem Zelltod entgingen.

7. Zusammenfassung

Die beiden Anti-CD20-Antikörper Rituximab und Obinutuzumab inhibierten in vitro das Zellwachstum in DLBCL-Zelllinien. Im Vergleich zu Rituximab verursachte Obinutuzumab stärker ausgeprägte homotypische Adhäsion von Tumorzellen und reduzierte das Zellwachstum effektiver. Rituximab führte zu G1-Arrest mehrerer Zelllinien. Nach Behandlung mit Obinutuzumab kam es nur in einer der getesteten Zelllinien zu G1-Arrest. Der Hauptmechanismus der Proliferationshemmung sind direkt zytotoxische Effekte. Die Bedeutung der Caspasenaktivität bleibt sehr unklar, könnte jedoch für eine Beteiligung klassischer Apoptosemechanismen sprechen. Der alternative, Caspase-unabhängige Mechanismus der Zelltodinduktion scheint insbesondere für Obinutuzumab der bedeutendere Mechanismus zu sein. Interessanterweise kam es während der ersten Stunden nach Behandlung in einigen Zelllinien zu einer verstärkten Phosphorylierung und damit Aktivierung der PI3K-, ERK1/2- und p38 MAPK-Signalwege. Diese aktivierenden Effekte waren nach Rituximab-Therapie stärker ausgeprägt. Erst zu späteren Zeitpunkten waren inhibitorische Effekte auf diese Signalwege nachweisbar. Aktivierung der p38-MAPK und daraus resultierender Apoptose ist nach Rituximab und Crosslinking beschrieben. Die Tatsachen, dass die p38 MAPK BCL-2 negativ reguliert und die hohe BCL-2-Expression in sensiblen Zelllinien, könnten möglicherweise auf einen BCL-2-abhängigen Mechanismus hindeuten.

Auch die beiden PI3K-Inhibitoren Idelalisib und LY294002 inhibierten das Zellwachstum, verursachten G1-Arrest und induzierten Apoptose. Auf molekularer Ebene zeigte sich die Inhibition von PI3K- und ERK1/2-Signalkomponenten. Nach Behandlung mit Idelalisib kam es nach 48 Stunden zur Reaktivierung des PI3K-Signalweges. Nach Behandlung mit LY294002 war diese Reaktivierung nicht nachweisbar. Dies könnte auf einen Escape-Mechanismus über andere PI3K-Untereinheiten nach Inhibition von PI3K δ hinweisen und könnte die stärkeren antiproliferativen Effekte des pan-PI3K-Inhibitors erklären. Interessanterweise kam es auch nach PI3K-Inhibition zu einer verstärkten Phosphorylierung der p38 MAPK. Dies deutet auf ein komplexes Zusammenspiel der PI3K-, ERK1/2- und p38 MAPK-Signalwege hin.

Nach Kombinationstherapie kam es in zwei t(14;18)-translozierten Zelllinien zu antagonistischen Effekten. Die direkt zytotoxischen Effekte der Anti-CD20-Antikörper wurden antagonisiert. Antagonistische Effekte waren in Kombination mit Rituximab stärker ausgeprägt als in Kombination mit Obinutuzumab. In allen anderen Zelllinien zeigten sich ausschließlich additive Effekte. Die Kombination von Obinutuzumab mit PI3K-Inhibitoren verursachte in allen untersuchten Zelllinien die stärkste Proliferationshemmung. Die Kombinationstherapie erhöhte die Ansprechrate der Zelllinien deutlich.

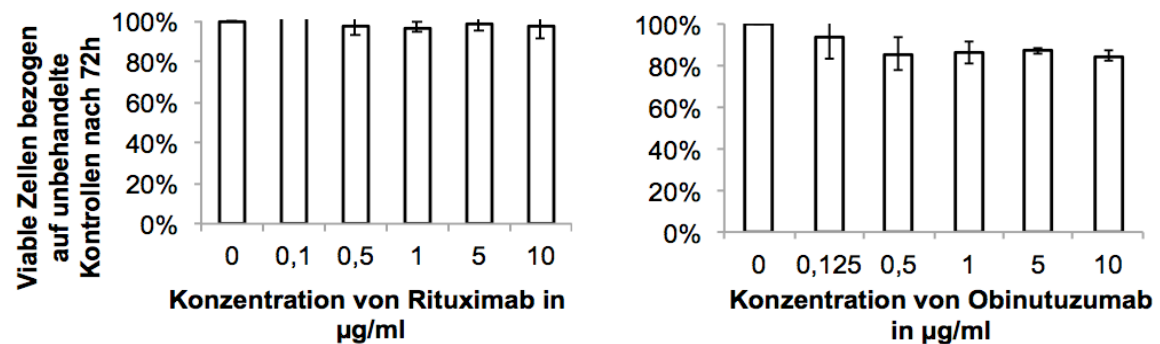
Die Addition von PI3K-Inhibitoren zur Immunochemotherapie könnte die Ansprechrate und Prognose von DLBCL-Patienten verbessern. Der genetische Hintergrund der Zellen könnte jedoch Einfluss auf die Interaktion der Substanzgruppen haben. Die Identifikation von Indikatoren für verschiedene Interaktionsmuster ist ein wichtiges Feld für die Forschung der Zukunft. Andere Effektormechanismen wie komplement-abhängige Zytotoxizität, zellvermittelte Mechanismen und passive Immunisierungsmechanismen wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt und stellen neben der geringen Zahl der Zelllinien und deren genetische Heterogenität eine große Limitation für die Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit in die Klinik dar.

8. Abkürzungsverzeichnis

4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
7AAD	7-aminoactinomycin D
aalPI	Alters-adaptierter Internationaler Prognostischer Index
Abb	Abbildung
ABC	activated B-cell like
ADCC	antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität
ADCP	antikörperabhängige, zellvermittelte Phagozytose
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Art. No	Artikel Nummer
ATCC	American Type Culture Collection
BCL2	B-cell lymphoma 2 protein
BCL6	B-cell lymphoma 6 protein
BCR	B-Zell Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
DLBCL	"Diffus large B-cell Lymphoma"; Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EBV	Ebstein Barr Virus
ECL	Elektrochemilumineszenz
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FA	Fraction affected
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fötales Kälberserum
FoP	Fraction of Product
FOXO	Forkhead-Box-Protein O3
FSC	forward light scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCB	"germinal center-like"
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
HIV	"human immunodeficiency virus" - humanes Immundefizienz-Virus
HRP	horseradish peroxidase
ID	Idelalisib
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPI	Internationaler Prognostischer Index
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
kDa	Kilodalton
Ki67	Kiel 67 Protein
LDH	Laktatdehydrogenase

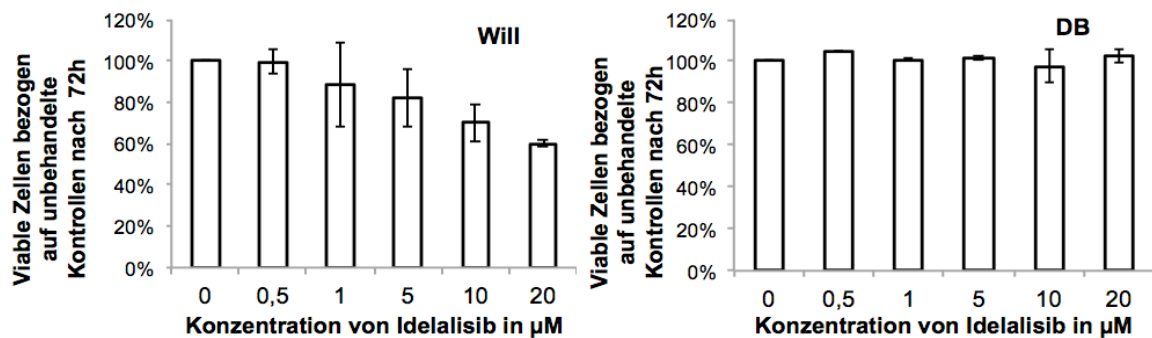
LY	LY294002
LY294002	2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one
MACS	Magnetic Cell Isolation and Cell Separation
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCL	Mantelzelllymphom
MHC	"Major Histocompatibility Complex" - Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	milliliter
mM	millimolar
MS	Microsoft
mTor	"mechanistic Target of Rapamycin"
MUM-1	Multiple Myeloma Oncogene 1
MW	Molekulargewicht
n.s.	nicht signifikant
NF- κ B	"nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells"
NHL	non-Hodgkin Lymphom
NKZ	Natürliche Killerzellen
non-GCB	non-germinal center-like
NOS	"not other specified" - nicht weiter spezifiziert
OTM	Obinutuzumab
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCD	"programmed cell death" - programmierter Zelltod
PDK1	Phosphoinositide-dependent Kinase-1
ph	phosphoryliert
PI	Propidium Iodid
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP3	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PS	Phosphatidylserin
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R-CHOP ..	Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunomycin, Vincristin, Prednisolon
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	"reactive oxygen species" - reaktive Sauerstoffspezies
rpm	"rounds per minute" - Umdrehungen pro Minute
Kulturmedium RPMI 1640 ...	Kulturmedium 1640 des Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
RTX	Rituximab
SDS-Page	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,
SLL	"small lymphocytic lymphoma" - kleinzelliges lymphatisches Lymphom
SSC	side scatter
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TCR	T-Zell Rezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Vol	Volumen
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Anhang



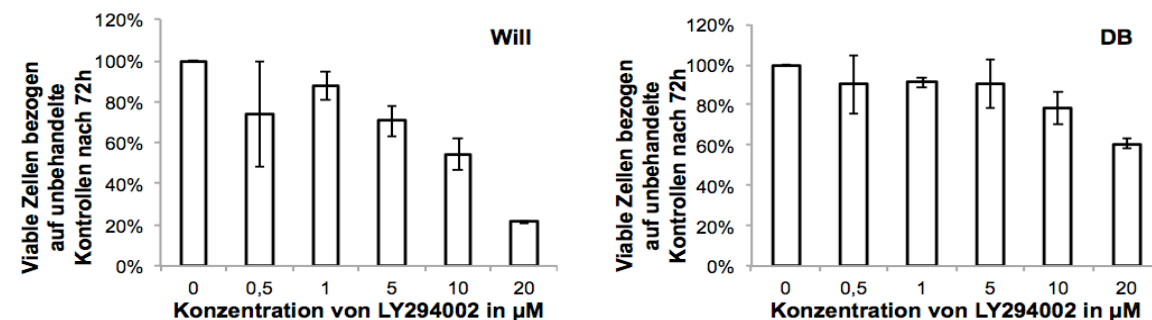
Anhang 1: Proliferationshemmung nach Behandlung mit Anti-CD20-Antikörpern

CD20-negative Zelllinie Will nach 72 Stunden Inkubation mit steigenden Konzentrationen von Rituximab oder Obinutuzumab.



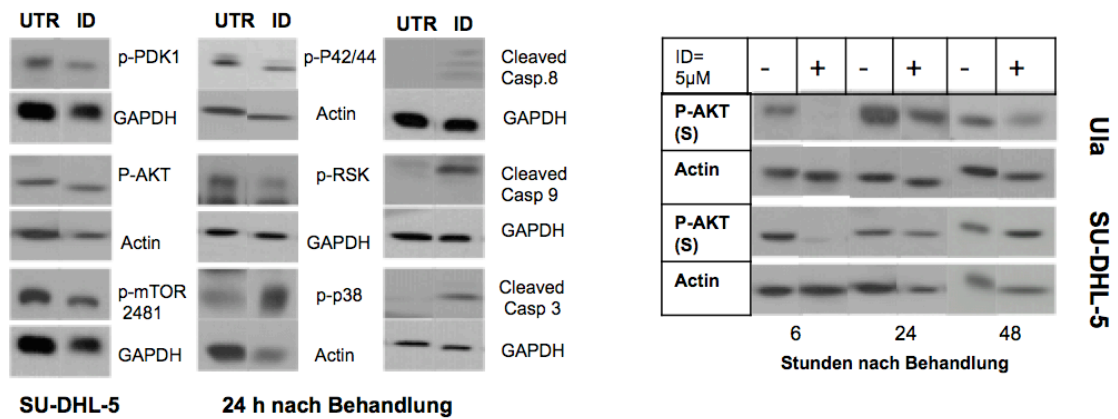
Anhang 2: Proliferationshemmung durch Idelalisib

Zelllinien Will und DB nach 72 Stunden Inkubation mit steigenden Konzentrationen von Idelalisib.



Anhang 3: Proliferationshemmung durch LY294002

Zelllinien Will und DB nach 72 Stunden Inkubation mit steigenden Konzentrationen von LY294002.



Anhang 4: Western Blot-Analysen

Komponenten der PI3K-, ERK1/2- und p38 MAPK-Signalwege nach 24 Stunden Inkubation mit Idelalisib (links). Zeitlicher Verlauf von p-AKT in den Zelllinien Ula und SU-DHL5 (rechts).

Rituximab + Idelalisib

Obinutuzumab + Idelalisib

SU-DHL 4	Viable Zellen in % der unbehandelten Kontrollen	Stunden nach Behandlung		Stunden nach Behandlung			
		SU-DHL 4	24	48	SU-DHL 4	24	48
		Kontrolle	100	100	Kontrolle	100	100
		RTX	80 (+-8)	72 (+-6)	OTM	82 (+-7)	80 (+-9)
		ID	101 (+-5)	99 (+-5)	ID	101 (+-5)	99 (+-5)
	RTX+ID	96 (+-7)	82 (+-4)	OTM+ID	100 (+-4)	84 (+-3)	
p-Werte	RTX:RTX+ID	0,002	0,008	OTM:OTM+ID	0,015	0,127	
ID:RTX+ID	0,422	<0,001	ID:OTM+ID	0,801	0,007		

HT	Viable Zellen in % der unbehandelten Kontrollen	Stunden nach Behandlung				Stunden nach Behandlung			
		HT	24	48	72	HT	24	48	72
		Kontrolle	100	100	100	Kontrolle	100	100	100
		RTX	99 (+-6)	96 (+-4)	98 (+-5)	OTM	103 (+-7)	99 (+-7)	101 (+-4)
		ID	92 (+-4)	77 (+-5)	72 (+-7)	ID	92 (+-4)	77 (+-5)	72 (+-7)
	RTX+ID	96 (+-7)	75 (+-10)	72 (+-7)	OTM+ID	93 (+-8)	76 (+-7)	73 (+-9)	
p-Werte	RTX:RTX+ID	0,124	<0,001	<0,001	OTM:OTM+ID	0,007	<0,001	<0,001	
ID:RTX+ID	0,418	0,665	0,974	ID:OTM+ID	0,661	0,796	0,599		

Will	Viable Zellen in % der unbehandelten Kontrollen	Stunden nach Behandlung				Stunden nach Behandlung			
		Will	24	48	72	Will	24	48	72
		Kontrolle	100	100	100	Kontrolle	100	100	100
		RTX	96 (+-6)	98 (+-5)	97 (+-3)	OTM	96 (+-6)	97 (+-6)	98 (+-5)
		ID	94 (+-9)	89 (+-6)	80 (+-6)	ID	94 (+-9)	89 (+-6)	80 (+-6)
	RTX+ID	91 (+-4)	86 (+-8)	79 (+-3)	OTM+ID	92 (+-6)	76 (+-13)	79 (+-5)	
p-Werte	RTX:RTX+ID	0,132	0,013	<0,001	OTM:OTM+ID	0,207	0,019	0,013	
ID:RTX+ID	0,597	0,506	0,624	ID:OTM+ID	0,343	0,101	0,366		

HBL-1	Viable Zellen in % der unbehandelten Kontrollen	Stunden nach Behandlung				Stunden nach Behandlung			
		HBL-1	24	48	72	HBL-1	24	48	72
		Kontrolle	100	100	100	Kontrolle	100	100	100
		RTX	93 (+-6)	96 (+-4)	92 (+-5)	OTM	83 (+-8)	70 (+-6)	64 (+-7)
		ID	97 (+-4)	86 (+-7)	75 (+-8)	ID	97 (+-4)	86 (+-7)	75 (+-8)
	RTX+ID	94 (+-7)	86 (+-5)	78 (+-5)	OTM+ID	85 (+-9)	68 (+-7)	53 (+-4)	
p-Werte	RTX:RTX+ID	0,333	0,691	0,110	OTM:OTM+ID	0,409	0,329	0,276	
ID:RTX+ID	0,635	0,748	0,798	ID:OTM+ID	0,186	<0,001	0,069		

Anhang 5: Proliferationshemmung durch Kombinationstherapie

Kombination von Rituximab mit Idelalisib (links), Obinutuzumab mit Idelalisib (rechts) in 5 DLBCL-Zelllinien im zeitlichen Verlauf. Antagonistische Interaktionen rot, additive Effekte grün und signifikante Abweichungen sind grau hinterlegt.

Rituximab + LY294002

Ula	Viable Zellen in % bezogen auf unbehandelte Kontrollen	Stunden nach Behandlung			
		Ula	24	48	72
		Kontrolle	100	100	100
		RTX	80 (+-5)	77 (+-6)	73 (+-6)
		LY	95 (+-5)	73 (+-5)	56 (+-7)
		RTX+LY	102 (+-6)	72 (+-8)	55 (+-6)
p-Werte		RTX:RTX+LY	<0,001	0,144	<0,001
		LY:RTX+LY	0,306	0,766	0,571

Obinutuzumab + LY294002

	Viable Zellen in % bezogen auf unbehandelte Kontrollen	Stunden nach Behandlung			
		Ula	24	48	72
		Kontrolle	100	100	100
		OTM	71 (+-7)	69 (+-5)	58 (+-7)
		LY	95 (+-5)	73 (+-5)	56 (+-7)
		OTM+LY	86 (+-6)	68 (+-8)	49 (+-6)
p-Werte		OTM:OTM+LY	0,26	0,994	0,588
		LY:OTM+LY	0,003	0,224	0,846

SU-DHL 4	Viable Zellen in % bezogen auf unbehandelte Kontrollen	Stunden nach Behandlung		
		SU-DHL 4	24	48
		Kontrolle	100	100
		RTX	80 (+-8)	72 (+-6)
		LY	92 (+-5)	78 (+-3)
		RTX+LY	94 (+-4)	73 (+-3)
p-Werte		RTX:RTX+LY	0,011	0,778
		LY:RTX+LY	0,608	0,155

	Viable Zellen in % bezogen auf unbehandelte Kontrollen	Stunden nach Behandlung		
		SU-DHL 4	24	48
		Kontrolle	100	100
		OTM	82 (+-7)	80 (+-9)
		LY	92 (+-5)	78 (+-3)
		OTM+LY	104 (+-8)	65 (+-6)
p-Werte		OTM:OTM+LY	0,031	0,234
		LY:OTM+LY	0,092	0,033

SU-DHL 5	Viable Zellen in % bezogen auf unbehandelte Kontrollen	Stunden nach Behandlung			
		SU-DHL 5	24	48	72
		Kontrolle	100	100	100
		RTX	95 (+-8)	96 (+-6)	90 (+-8)
		LY	79 (+-8)	51 (+-6)	42 (+-3)
		RTX+LY	85 (+-3)	47 (+-6)	31 (+-2)
p-Werte		RTX:RTX+LY	0,021	<0,001	<0,001
		LY:RTX+LY	0,669	0,218	<0,001

	Viable Zellen in % bezogen auf unbehandelte Kontrollen	Stunden nach Behandlung			
		SU-DHL 5	24	48	72
		Kontrolle	100	100	100
		OTM	111(+9)	101(+9)	78 (+-9)
		LY	79 (+-8)	51 (+-6)	42 (+-3)
		OTM+LY	79 (+-4)	48 (+-4)	34 (+-4)
p-Werte		OTM:OTM+LY	0,001	<0,001	<0,001
		LY:OTM+LY	0,594	0,609	0,006

U2932	Viable Zellen in % bezogen auf unbehandelte Kontrollen	Stunden nach Behandlung			
		U2932	24	48	72
		Kontrolle	100	100	100
		RTX	70 (+-7)	64 (+-6)	59 (+-6)
		LY	97 (+-15)	96 (+-16)	90 (+-10)
		RTX+LY	70 (+-10)	62 (+-9)	58(+11)
p-Werte		RTX:RTX+LY	0,945	0,588	0,874
		LY:RTX+LY	0,022	<0,001	0,001

	Viable Zellen in % bezogen auf unbehandelte Kontrollen	Stunden nach Behandlung			
		U2932	24	48	72
		Kontrolle	100	100	100
		OTM	44 (+-7)	43 (+-7)	43 (+-5)
		LY	97 (+-15)	96 (+-16)	90 (+-10)
		OTM+LY	43(+19)	42 (+-7)	36(+6)
p-Werte		OTM:OTM+LY	0,822	0,733	0,002
		LY:OTM+LY	<0,001	<0,001	<0,001

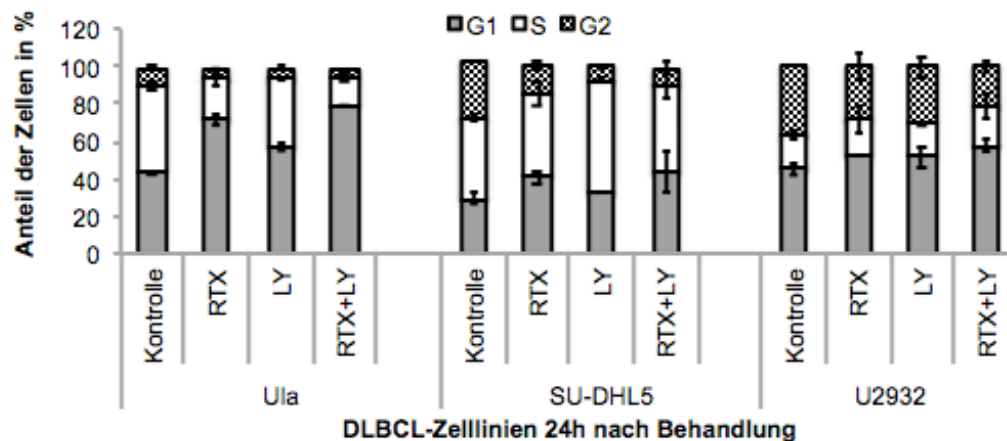
HT	Viable Zellen in % bezogen auf unbehandelte Kontrollen	Stunden nach Behandlung			
		HT	24	48	72
		Kontrolle	100	100	100
		RTX	99 (+-6)	96 (+-4)	98 (+-5)
		LY	91 (+-5)	74 (+-10)	66 (+-9)
		RTX+LY	95 (+-7)	74 (+-10)	66 (+-7)
p-Werte		RTX:RTX+LY	0,184	<0,001	<0,001
		LY:RTX+LY	0,871	0,952	0,686

	Viable Zellen in % bezogen auf unbehandelte Kontrollen	Stunden nach Behandlung			
		HT	24	48	72
		Kontrolle	100	100	100
		OTM	103 (+-7)	99 (+-7)	101 (+-4)
		LY	91 (+-5)	74 (+-10)	66 (+-9)
		OTM+LY	98 (+-7)	74 (+-7)	69 (+-8)
p-Werte		OTM:OTM+LY	0,281	<0,001	<0,001
		LY:OTM+LY	0,420	0,982	0,743

Anhang 6: Proliferationshemmung durch Kombinationstherapie

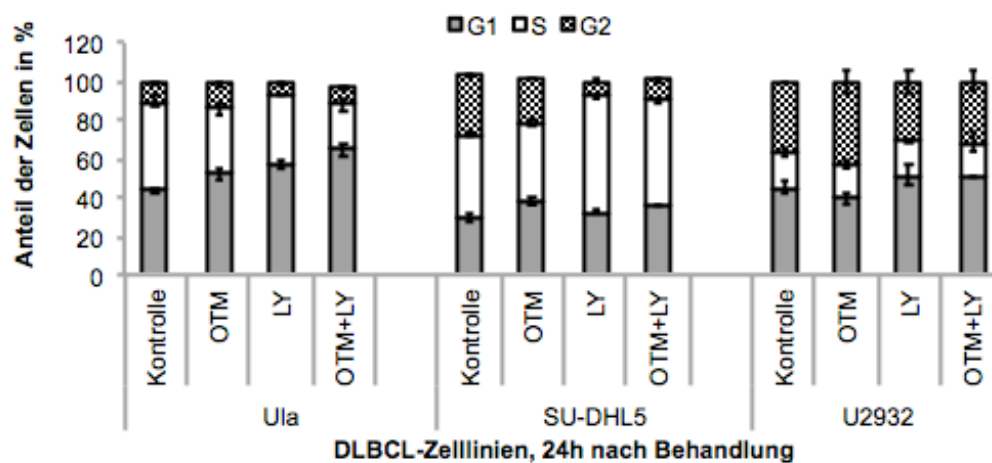
Kombination von Rituximab und LY294002 (links), Obinutuzumab und LY294002 (rechts) in 5 DLBCL-Zelllinien im zeitlichen Verlauf. Antagonistische Interaktionen rot, additive Effekte grün und signifikante Abweichungen sind grau hinterlegt.

A. Rituximab + LY294002



p-Werte	Ula	SU-DHL 5	U2932
UTR:RTX	0,002	0,017	0,147
UTR:LY	0,001	0,150	0,314
UTR:RTX+LY	<0,001	0,302	0,068
RTX:RTX+LY	0,058	0,771	0,298
LY:RTX+LY	0,001	0,387	0,371

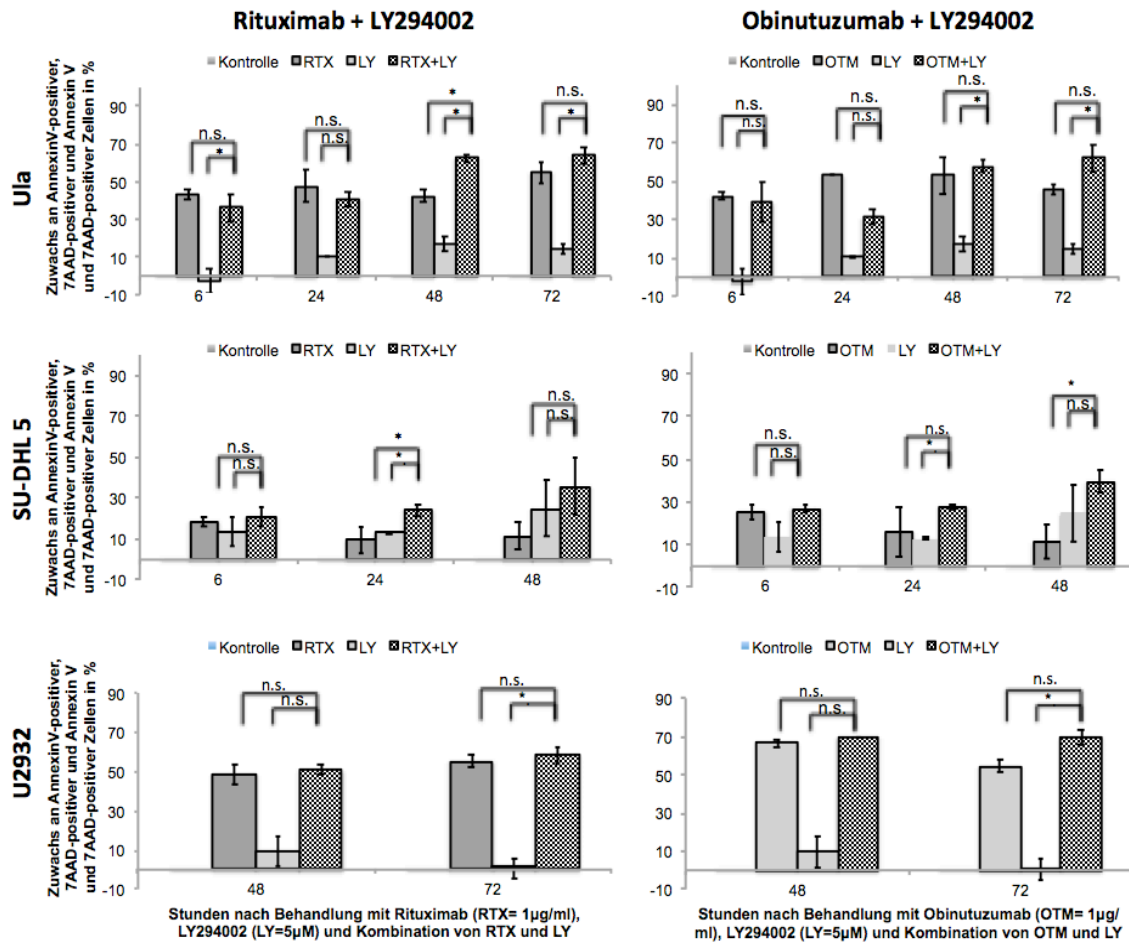
B. Obinutuzumab + LY294002



p-Werte	Ula	SU-DHL 5	U2932
UTR:OTM	0,080	0,013	0,231
UTR:LY	0,001	0,150	0,314
UTR:OTM+LY	0,007	0,140	0,217
OTM:OTM+LY	0,122	0,632	0,128
LY:OTM+LY	0,050	0,244	0,796

Anhang 7: Zellzyklusanalysen mit PI-Färbung

Kombination aus Rituximab mit LY294002 (A) und Obinutuzumab mit LY294002 (B) in 3 DLBCL-Zelllinien 24 Stunden nach Behandlung. Unten sind die entsprechenden p-Werte der G1-Phase dargestellt. Signifikante Abweichungen sind grau hinterlegt.



Anhang 8: Zytotoxische Effekte nach Kombinationstherapie

Kombination aus Rituximab mit LY294002 (links) und Obinutuzumab mit LY294002 (rechts) in 3 DLBCL-Zelllinien im zeitlichen Verlauf.

10. Literaturverzeichnis

1. Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES, Chan J, Gatter K, et al. Diffuse Large B-cell Lymphoma, not otherwise specified, 2008.
2. Anon. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997 Jun 1;89(11):3909-18.
3. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998 Aug;16(8):2780-95.
4. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. Critical reviews in oncology/hematology. 2013 Aug;87(2):146-71.
5. Hummel M, Anagnostopoulos I, Korbjuhn P, Stein H. Epstein-Barr virus in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: unexpected infection patterns and different infection incidence in low- and high-grade types. *The Journal of pathology*. 1995 Mar;175(3):263-71.
6. Park S, Lee J, Ko YH, Han A, Jun HJ, Lee SC, et al. The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):972-8.
7. Vianna NJ. The malignant lymphomas: epidemiology and related aspects. *Pathobiology annual*. 1977;7:231-55.
8. Cerhan JR, Kricker A, Paltiel O, Flowers CR, Wang SS, Monnereau A, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for diffuse large B-cell lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2014 Aug;2014(48):15-25.
9. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994 Sep 1;84(5):1361-92.
10. Campbell J, Seymour JF, Matthews J, Wolf M, Stone J, Juneja S. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *European journal of haematology*. 2006 Jun;76(6):473-80.
11. Chung R, Lai R, Wei P, Lee J, Hanson J, Belch AR, et al. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1278-82.
12. Loddenkemper C, Anagnostopoulos I, Hummel M, Johrens-Leder K, Foss HD, Jundt F, et al. Differential Emu enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *The Journal of pathology*. 2004 Jan;202(1):60-9.
13. Piris M, Brown DC, Gatter KC, Mason DY. CD30 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*. 1990 Sep;17(3):211-8.
14. Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, Matsuo K, Karnan S, Ohshima K, et al. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1770-7.
15. Matolcsy A, Chadburn A, Knowles DM. De novo CD5-positive and Richter's syndrome-associated diffuse large B cell lymphomas are genotypically distinct. *The American journal of pathology*. 1995 Jul;147(1):207-16.
16. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M, Ichinohasama R, Nakamura N, Yoshino T, et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):815-21.
17. Amen F, Horncastle D, Elderfield K, Banham AH, Bower M, Macdonald D, et al. Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients. *Histopathology*. 2007 Jul;51(1):70-9.
18. Berglund M, Thunberg U, Amini RM, Book M, Roos G, Erlanson M, et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005 Aug;18(8):1113-20.
19. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003 Jan 1;101(1):78-84.
20. de Leval L, Harris NL. Variability in immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance. *Histopathology*. 2003 Dec;43(6):509-28.
21. Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *The New England journal of medicine*. 2006 Jun 8;354(23):2419-30.
22. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of pathology*. 2006 Apr;208(5):714-23.
23. Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, Spier CM, Braziel RM, Banks PM, et al. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood*. 1994 Mar 15;83(6):1460-6.

24. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):275-82.
25. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000 Feb 3;403(6769):503-11.
26. Alizadeh AA, Gentles AJ, Lossos IS, Levy R. Molecular outcome prediction in diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2009 Jun 25;360(26):2794-5.
27. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):1857-61.
28. Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene*. 2007 May 28;26(25):3603-13.
29. Jazirehi AR, Bonavida B. Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene*. 2005 Mar 24;24(13):2121-43.
30. Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, Saito H. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988 Jan;85(1):208-12.
31. Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *The EMBO journal*. 1988 Mar;7(3):711-7.
32. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1980 Oct;125(4):1678-85.
33. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Current directions in autoimmunity*. 2005;8:140-74.
34. Alduaij W, Illidge TM. The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: are we making progress? *Blood*. 2011 Mar 17;117(11):2993-3001.
35. Boross P, Leusen JH. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *American journal of cancer research*. 2012;2(6):676-90.
36. Lim SH, Beers SA, French RR, Johnson PW, Glennie MJ, Cragg MS. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica*. 2010 Jan;95(1):135-43.
37. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994 Jan 15;83(2):435-45.
38. Kennedy AD, Solga MD, Schuman TA, Chi AW, Lindorfer MA, Sutherland WM, et al. An anti-C3b(i) mAb enhances complement activation, C3b(i) deposition, and killing of CD20+ cells by rituximab. *Blood*. 2003 Feb 1;101(3):1071-9.
39. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2000 Mar;48(12):673-83.
40. Lim SH, Levy R. Translational medicine in action: anti-CD20 therapy in lymphoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014 Aug 15;193(4):1519-24.
41. Chan HT, Hughes D, French RR, Tutt AL, Walshe CA, Teeling JL, et al. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer research*. 2003 Sep 01;63(17):5480-9.
42. Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens JP, Jacob MC, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2003 Feb 01;101(3):949-54.
43. Tedder TF, Forsgren A, Boyd AW, Nadler LM, Schlossman SF. Antibodies reactive with the B1 molecule inhibit cell cycle progression but not activation of human B lymphocytes. *European journal of immunology*. 1986 Aug;16(8):881-7.
44. Bonavida B. What signals are generated by anti-CD20 antibody therapy? *Current hematologic malignancy reports*. 2006 Dec;1(4):205-13.
45. Pedersen IM, Buhl AM, Klausen P, Geisler CH, Jurlander J. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood*. 2002 Feb 15;99(4):1314-9.
46. Demidem A, Lam T, Alas S, Hariharan K, Hanna N, Bonavida B. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 1997 Jun;12(3):177-86.
47. Heinrich DA, Weinkauff M, Hutter G, Zimmermann Y, Jurinovic V, Hiddemann W, et al. Differential regulation patterns of the anti-CD20 antibodies obinutuzumab and rituximab in mantle cell lymphoma. *British journal of haematology*. 2014 Feb;168(4):606-10.
48. Ghetie MA, Podar EM, Ilgen A, Gordon BE, Uhr JW, Vitetta ES. Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 Jul 08;94(14):7509-14.
49. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, Aron JL, Pearson M, Lucas D, et al. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood*. 2002 Feb 01;99(3):1038-43.

50. Mathas S, Rickers A, Bommert K, Dorken B, Mapara MY. Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways. *Cancer research*. 2000 Dec 15;60(24):7170-6.
51. Bezombes C, Fournie JJ, Laurent G. Direct effect of rituximab in B-cell-derived lymphoid neoplasias: mechanism, regulation, and perspectives. *Molecular cancer research : MCR*. 2011 Nov;9(11):1435-42.
52. Jeyakumar D, O'Brien S. The Next Generation of Targeted Molecules for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncology (Williston Park, NY)*. 2016 Nov 15;30(11).
53. Decaup E, Jean C, Laurent C, Gravelle P, Fruchon S, Capilla F, et al. Anti-tumor activity of obinutuzumab and rituximab in a follicular lymphoma 3D model. *Blood cancer journal*. 2013;3:e131.
54. Gabellier L, Cartron G. Obinutuzumab for relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Therapeutic advances in hematology*. 2016 Apr;7(2):85-93.
55. Dalle S, Reslan L, Besseyre de Horts T, Herveau S, Herting F, Plesa A, et al. Preclinical studies on the mechanism of action and the anti-lymphoma activity of the novel anti-CD20 antibody GA101. *Molecular cancer therapeutics*. 2011 Jan;10(1):178-85.
56. Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH, et al. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood*. 2011 Apr 28;117(17):4519-29.
57. Honeychurch J, Alduaij W, Azizyan M, Cheadle EJ, Pelicano H, Ivanov A, et al. Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3523-33.
58. Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010 Jun 03;115(22):4393-402.
59. Marcus R, Davies A, Ando K, Klapper W, Opat S, Owen C, et al. Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2017 Oct 5;377(14):1331-44.
60. Marcus R, Seymour JF, Hiddemann W. Obinutuzumab Treatment of Follicular Lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2017 Dec 28;377(26):2605-6.
61. Vitolo U, Trneny M, Belada D, Burke JM, Carella AM, Chua N, et al. Obinutuzumab or Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017 Nov 1;35(31):3529-37.
62. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *The New England journal of medicine*. 2002 Nov 14;347(20):1593-603.
63. Schmitt CA. Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003 Apr;3(4):286-95.
64. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2001 Dec;1(3):222-31.
65. Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nature reviews Cancer*. 2003 Mar;3(3):179-92.
66. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature reviews Cancer*. 2009 Aug;9(8):550-62.
67. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in oncology*. 2014;4:64.
68. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews Cancer*. 2002 Jul;2(7):489-501.
69. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer cell*. 2003 Oct;4(4):257-62.
70. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Apr 13;96(8):4240-5.
71. Seda V, Mraz M. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *European journal of haematology*. 2014 Aug 1.
72. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget*. 2011 Mar;2(3):135-64.
73. Burgering BM, Medema RH. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *Journal of leukocyte biology*. 2003 Jun;73(6):689-701.
74. Jabbour E, Ottmann OG, Deininger M, Hochhaus A. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematologic malignancies. *Haematologica*. 2014 Jan;99(1):7-18.
75. Pfeifer M, Grau M, Lenze D, Wenzel SS, Wolf A, Wollert-Wulf B, et al. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013 Jul 23;110(30):12420-5.
76. Kloo B, Nagel D, Pfeifer M, Grau M, Duwel M, Vincendeau M, et al. Critical role of PI3K signaling for NF-kappaB-dependent survival in a subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Jan 4;108(1):272-7.

77. Workman P, Clarke PA, Raynaud FI, van Montfort RL. Drugging the PI3 kinome: from chemical tools to drugs in the clinic. *Cancer research*. 2010 Mar 15;70(6):2146-57.
78. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of biological chemistry*. 1994 Feb 18;269(7):5241-8.
79. Feldman ME, Shokat KM. New inhibitors of the PI3K-Akt-mTOR pathway: insights into mTOR signaling from a new generation of Tor Kinase Domain Inhibitors (TORKinibs). *Current topics in microbiology and immunology*. 2010;347:241-62.
80. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood*. 2010 Sep 23;116(12):2078-88.
81. Barrientos JC. Idelalisib for the treatment of indolent non-Hodgkin lymphoma: a review of its clinical potential. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:2945-53.
82. Beckwith M, Longo DL, O'Connell CD, Moratz CM, Urba WJ. Phorbol ester-induced, cell-cycle-specific, growth inhibition of human B-lymphoma cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*. 1990 Mar 21;82(6):501-9.
83. Nozawa Y, Abe M, Wakasa H, Ohno H, Fukuhara S, Kinoshita T, et al. Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus negative B-cell lymphoma cell line and successful heterotransplantation. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 1988 Dec;156(4):319-30.
84. Hecht BK, Epstein AL, Berger CS, Kaplan HS, Hecht F. Histiocytic lymphoma cell lines: immunologic and cytogenetic studies. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1985 Jan 15;14(3-4):205-18.
85. Siminovitsh KA, Jensen JP, Epstein AL, Korsmeyer SJ. Immunoglobulin gene rearrangements and expression in diffuse histiocytic lymphomas reveal cellular lineage, molecular defects, and sites of chromosomal translocation. *Blood*. 1986 Feb;67(2):391-7.
86. Epstein AL, Kaplan HS. Feeder layer and nutritional requirements for the establishment and cloning of human malignant lymphoma cell lines. *Cancer research*. 1979 May;39(5):1748-59.
87. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*. 1985 Jul;41(3):899-906.
88. Amini RM, Berglund M, Rosenquist R, Von Heideman A, Lagercrantz S, Thunberg U, et al. A novel B-cell line (U-2932) established from a patient with diffuse large B-cell lymphoma following Hodgkin lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2002 Nov;43(11):2179-89.
89. Lenz G, Nagel I, Siebert R, Roschke AV, Sanger W, Wright GW, et al. Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of experimental medicine*. 2007 Mar 19;204(3):633-43.
90. Berglund M, Thunberg U, Fridberg M, Wingren AG, Gullbo J, Leuchowius KJ, et al. Establishment of a cell line from a chemotherapy resistant diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2007 May;48(5):1038-41.
91. Sonoki T, Li Y, Miyanishi S, Nakamine H, Hanaoka N, Matsuoka H, et al. Establishment of a novel CD20 negative mature B-cell line, WILL2, from a CD20 positive diffuse large B-cell lymphoma patient treated with rituximab. *International journal of hematology*. 2009 Apr;89(3):400-2.
92. Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE, Kashishian A, Steiner B, Johnson AJ, et al. CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):591-4.
93. Chaussade C, Rewcastle GW, Kendall JD, Denny WA, Cho K, Gronning LM, et al. Evidence for functional redundancy of class IA PI3K isoforms in insulin signalling. *The Biochemical journal*. 2007 Jun 15;404(3):449-58.
94. Semba S, Itoh N, Ito M, Harada M, Yamakawa M. The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002 Jun;8(6):1957-63.
95. Ehrlich PaKS. Farbenherapeutische versuche bei trypanosomenerkrankung. *Berliner klinische Wochenschrift*. 1904: 329-32.
96. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*. 2001.
97. Killemann UaES. Vergleich verschiedenster Methoden zur Bestimmung von Zellzahlen und Zellvitalitäten bei der Optimierung der Formulierung von Kulturmedien mit Hybridoma-Zellen. *Biospektrum*. 2004.
98. GMBH B. Separating solutions and lectins: Biocoll. *Biochrom*. 2015.
99. Berridge MV, et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*. 1996.
100. Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2003 Nov;44(11):1957-62.
101. Science RA. Cell Proliferation Reagent WST-1. 2006.
102. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*. 2018 Feb 21;120:5.1.-5.1.11.
103. Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of cell biology*. 1975 Jul;66(1):188-93.

104. Darzynkiewicz Z, Huang X. Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Current protocols in immunology*. 2004 May;Chapter 5:Unit 5.7.
105. Watson JV, Chambers SH, Smith PJ. A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry*. 1987 Jan;8(1):1-8.
106. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1992 Apr 1;148(7):2207-16.
107. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods*. 1995 Jul 17;184(1):39-51.
108. Zembruski NC, Stache V, Haefeli WE, Weiss J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Analytical biochemistry*. 2012 Oct 1;429(1):79-81.
109. Lecoeur H, Ledru E, Prevost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *Journal of immunological methods*. 1997 Dec 1;209(2):111-23.
110. Webb JL. Enzyme and metabolic inhibitors Vol. 1. Enzyme and metabolic inhibitors. 1963:p. 55-79; 488-512.
111. Tilly H, Dreyling M. Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2008 May;19 Suppl 2:ii67-9.
112. Alinari L, Christian B, Baiocchi RA. Novel targeted therapies for mantle cell lymphoma. *Oncotarget*. 2012 Feb;3(2):203-11.
113. Chantry D, Vojtek A, Kashishian A, Holtzman DA, Wood C, Gray PW, et al. p110delta, a novel phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit that associates with p85 and is expressed predominantly in leukocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1997 Aug 01;272(31):19236-41.
114. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*. 1998 Mar 1;91(5):1644-52.
115. Semac I, Palomba C, Kulangara K, Klages N, van Echten-Deckert G, Borisch B, et al. Anti-CD20 therapeutic antibody rituximab modifies the functional organization of rafts/microdomains of B lymphoma cells. *Cancer research*. 2003 Jan 15;63(2):534-40.
116. Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology*. 2002 Oct;107(2):176-82.
117. De Chiara G, Marocchi ME, Torcia M, Lucibello M, Rosini P, Bonini P, et al. Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Jul 28;281(30):21353-61.
118. Correia C, Lee SH, Meng XW, Vincelette ND, Knorr KL, Ding H, et al. Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. *Biochimica et biophysica acta*. 2015 Jul;1853(7):1658-71.
119. Olejniczak SH, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Clements JL, Czuczman MS. Acquired resistance to rituximab is associated with chemotherapy resistance resulting from decreased Bax and Bak expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008 Mar 01;14(5):1550-60.
120. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile JF, Lederlin P, Sebban C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood*. 2003 Jun 01;101(11):4279-84.
121. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*. 2014 Feb;13(2):140-56.
122. Jazirehi AR, Vega MI, Chatterjee D, Goodglick L, Bonavida B. Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer research*. 2004 Oct 1;64(19):7117-26.
123. Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immuno-resistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene*. 2007 May 28;26(25):3629-36.
124. Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001 Mar;7(3):709-23.
125. Vega MI, Huerta-Yepaz S, Garban H, Jazirehi A, Emmanouilides C, Bonavida B. Rituximab inhibits p38 MAPK activity in 2F7 B NHL and decreases IL-10 transcription: pivotal role of p38 MAPK in drug resistance. *Oncogene*. 2004 Apr 29;23(20):3530-40.
126. Jazirehi AR, Huerta-Yepaz S, Cheng G, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- κ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer research*. 2005 Jan 1;65(1):264-76.
127. Jazirehi AR, Gan XH, De Vos S, Emmanouilides C, Bonavida B. Rituximab (anti-CD20) selectively modifies Bcl-xL and apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) expression and sensitizes human non-Hodgkin's lymphoma B cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Molecular cancer therapeutics*. 2003 Nov;2(11):1183-93.

128. Suzuki E, Umezawa K, Bonavida B. Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene*. 2007 Sep 13;26(42):6184-93.
129. So L, Fruman DA. PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: new developments and therapeutic advances. *The Biochemical journal*. 2012 Mar 15;442(3):465-81.
130. Will M, Qin AC, Toy W, Yao Z, Rodrik-Outmezguine V, Schneider C, et al. Rapid Induction of Apoptosis by PI3K Inhibitors Is Dependent upon Their Transient Inhibition of RAS-ERK Signaling. *Cancer discovery*. 2014 Mar;4(3):334-47.
131. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, Staudt LM, Weisenburger DD, Pickering DL, et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood*. 2002 Apr 1;99(7):2285-90.
132. Zelenetz AD, Barrientos JC, Brown JR, Coiffier B, Delgado J, Egyed M, et al. Idelalisib or placebo in combination with bendamustine and rituximab in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: interim results from a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2017 Mar;18(3):297-311.
133. Da Roit F, Engelberts PJ, Taylor RP, Breij EC, Gritti G, Rambaldi A, et al. Ibrutinib interferes with the cell-mediated anti-tumour activities of therapeutic CD20 antibodies: implications for combination therapy. *Haematologica*. 2014 Oct 24.
134. Bojarczuk K, Siernicka M, Dwojak M, Bobrowicz M, Pyrzynska B, Gaj P, et al. B-cell receptor pathway inhibitors affect CD20 levels and impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia*. 2014 May;28(5):1163-7.
135. Borge M, Belen Almejún M, Podaza E, Colado A, Fernandez Grecco H, Cabrejo M, et al. Ibrutinib impairs the phagocytosis of rituximab-coated leukemic cells from chronic lymphocytic leukemia patients by human macrophages. *Haematologica*. 2015 Apr;100(4):e140-2.
136. Kohrt HE, Sagiv-Barfi I, Rafiq S, Herman SE, Butchar JP, Cheney C, et al. Ibrutinib antagonizes rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2014 Mar 20;123(12):1957-60.
137. Tan L, Lin P, Chisti MM, Rehman A, Zeng X. Real time analysis of binding between Rituximab (anti-CD20 antibody) and B lymphoma cells. *Analytical chemistry*. 2013 Sep 17;85(18):8543-51.

Eidesstattliche Versicherung

Peter, Nico Joachim

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Gezielte molekulare Therapie des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms
In vitro Wirksamkeit der monoklonalen Anti-CD20-Antikörper Rituximab
und Obinutuzumab sowie der PI3K-Inhibitoren LY294002 und Idelalisib in
Mono- und Kombinationstherapie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren
Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz
oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und
nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln
nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in
gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung
eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München 06.11.2019

Ort, Datum
Doktorandin/Doktorand

Nico Peter

Unterschrift